

**Mutationsscreening im *RD3*-Gen
bei Patienten mit frühkindlichen und juvenilen Netzhautdegenerationen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Manuel Corbinian Solbach
aus Offenbach am Main

Gießen (2012)

Aus dem Labor für Molekulare Ophthalmologie
an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktorin der Klinik: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz

Gutachter: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Tag der Disputation: 09.01.2014

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
<hr/>	
1.1. Hereditäre Netzhautdystrophien.....	1
1.2. Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) / Frühkindliche schwere Netzhautdystrophie (EOSRD).....	2
1.2.1. LCA / EOSRD – Klinik und Diagnostik.....	2
1.2.2. LCA / EOSRD – Genetischer Hintergrund.....	3
1.2.3. LCA / EOSRD – Therapieansätze.....	6
1.3. Das <i>RD3</i> -Gen.....	6
1.3.1. Die Rolle des RD3-Proteins im Phototransduktionszyklus.....	6
▪ Aufbau der Netzhaut.....	6
▪ Phototransduktionsprozess.....	8
▪ Funktion des RD3-Proteins.....	10
1.3.2. Mutationen im <i>Rd3</i> -Gen der Maus.....	13
1.3.3. Mutationen im <i>RD3</i> -Gen des Hundes.....	14
1.3.4. Mutationen im <i>RD3</i> -Gen des Menschen.....	15
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	18
 2. Material und Methoden	 19
<hr/>	
2.1. Methodischer Überblick.....	19
2.2. Patienten.....	19
2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
2.3.1. Geräte.....	20
2.3.2. Chemikalien.....	21
2.3.3. Stammlösungen.....	21

2.3.4.	Enzyme.....	22
2.3.5.	Kits.....	22
2.4.	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.4.1.	Gewinnung der DNA-Proben.....	23
2.4.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.4.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.4.4.	Aufreinigung des PCR-Produkts für die Sequenzierung.....	28
2.4.5.	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes.....	29
2.4.6.	Sequenzierung der DNA.....	29
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Zusammensetzung des Patientenkollektivs.....	32
3.1.1.	Auswahl der Patienten nach phänotypischen Kriterien (Patientengruppe 1).....	37
3.1.1.1.	Patientengruppe 1a.....	37
	▪ Kriterien zur Auswahl von Patientengruppe 1a.....	37
	▪ Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 1a).....	39
3.1.1.2.	Patientengruppe 1b.....	53
	▪ Kriterien zur Auswahl von Patientengruppe 1b.....	53
	▪ Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 1b).....	53
3.1.1.3.	Patientengruppe 1c.....	60
	▪ Auswahl von Patientengruppe 1c.....	60
	▪ Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 1c).....	61
3.1.2.	Patienten mit bereits identifizierten Sequenzänderungen im <i>GUCY2D</i> -Gen (Patientengruppe 2).....	62
	▪ Auswahl von Patientengruppe 2.....	62
	▪ Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 2).....	63
3.2.	Molekulargenetische Ergebnisse des Mutationsscreenings.....	64

4. Diskussion	71
4.1. Einordnung der vorliegenden Arbeit in den derzeitigen Wissensstand.....	71
4.1.1. Generelle Abgrenzung des Beitrages gegenüber anderen Studien.....	71
4.1.2. Patientengruppe 1	74
▪ Besonderheiten der Zusammensetzung von Patientengruppe 1	74
▪ Molekulargenetische Besonderheiten bei Patientengruppe 1	76
4.1.3. Patientengruppe 2.....	77
▪ Besonderheiten der Zusammensetzung von Patientengruppe 2.....	77
▪ Molekulargenetische Besonderheiten bei Patientengruppe 2.....	80
4.2. Ausblick: Erforschung LCA-verursachender Gene als Voraussetzung für eine zukünftige Therapierbarkeit.....	81
4.3. Schlussgedanke	83
5. Zusammenfassung.....	84
6. Summary	86
7. Abkürzungsverzeichnis.....	88
8. Abbildungsverzeichnis	89
9. Tabellenverzeichnis	90
10. Literaturverzeichnis	91
11. Internetreferenzen	100
12. Publikationsverzeichnis	101
13. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	102
14. Danksagung.....	104

1. Einleitung

1.1. Hereditäre Netzhautdystrophien

Die Gruppe der hereditären Netzhautdystrophien umfasst eine Vielzahl retinaler Erbkrankheiten, welche nach unterschiedlichen Gesichtspunkten (wie z. B. Augenhintergrundbefund, Genetik oder Histologie) eingeteilt werden können. Eine allgemeingültige, uniforme Nomenklatur besteht hierbei nicht. [45]

Eine übersichtliche Möglichkeit der Einteilung ist die Unterscheidung zwischen regional begrenzten und generalisierten Dystrophien. Von diesen beiden großen Gruppen lassen sich ferner die mit Syndromen assoziierten Dystrophien und die stationären Netzhautfunktionsstörungen abgrenzen. [7] Während die regional begrenzten Störungen dabei v. a. die erblichen Makuladystrophien (wie Morbus Stargardt und Morbus Best) umfassen, betreffen die generalisierten Formen die gesamte Retina. [7,45] Letztere lassen sich wiederum nach der vorwiegenden Degeneration der einzelnen Photorezeptortypen in zwei Kategorien unterteilen, je nachdem, ob bevorzugt die Stäbchen oder die Zapfen betroffen sind bzw. welche Population bei Degeneration beider Zelltypen zuerst oder schwerer beeinträchtigt ist. Bei überwiegender Degeneration der Stäbchen spricht man von Stäbchen-Zapfen-Dystrophien, im umgekehrten Fall von Zapfen-Stäbchen-Dystrophien. [36] In die Gruppe der Stäbchen-Zapfen-Dystrophien kann dabei auch der Formenkreis der Retinopathia pigmentosa, der mit einer Prävalenz von weltweit ca. 1:5.000 häufigsten hereditären Netzhautdystrophie, eingeordnet werden. [97] Sie zeichnet sich entsprechend dem überwiegenden Ausfall der Stäbchenfunktion durch die Leitsymptome Nachtblindheit und konzentrische Einengung des Gesichtsfeldes aus. [32] Dagegen dominieren bei Erkrankungen mit Betonung auf dem Verlust der Zapfenfunktion neben verminderter Sehschärfe vornehmlich Farbsehstörungen und erhöhte Lichtempfindlichkeit. [32]

Eine besondere Gruppe innerhalb der erblichen Netzhautdystrophien stellt die EOSRD (= Early onset severe retinal dystrophy) als Überbegriff frühkindlicher und juveniler Dystrophieformen dar. Der Schweregrad des klinischen Bildes reicht dabei von weniger massiven Verläufen bis hin zur Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA, Leber's congenital amaurosis), die sich durch eine hochgradige Sehstörung der kleinen Patien-

ten bereits in den ersten Lebensmonaten auszeichnet. [92] Die bisher bekannten Unterformen der LCA unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrer genetischen Ursache, sondern sind auch phänotypisch heterogen (s. Abschnitt 1.2.2.). [81]

1.2. Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) / Frühkindliche schwere Netzhautdystrophie (EOSRD)

1.2.1. LCA / EOSRD – Klinik und Diagnostik

Erstbeschreiber der LCA war im Jahre 1869 der deutsche Augenarzt Theodor Leber, dem zu Ehren die Erkrankung ihren Namen (Lebersche kongenitale Amaurose) erhielt. [53] Die LCA kann als eine spezielle Form der Netzhautdystrophie angesehen werden, deren Besonderheit der sehr frühe Krankheitsbeginn ist. [32] Die betroffenen Kinder zeigen eine hochgradige Visusminderung bis hin zur Blindheit, die sich innerhalb des ersten Lebensjahres entwickelt oder sogar schon bei Geburt besteht. [7] Klinische Symptome infolge der beträchtlichen Sehschwäche können sich in Form von Augenzittern (Nystagmus), Schielen (Strabismus), fehlender Reaktion auf optische Reize bis hin zu fehlender Pupillenreaktion, okulodigitalem Phänomen (Franceschetti-Zeichen, Erläuterung s. Abschnitt 3.1.1.1) und Lichtscheu (Photophobie) manifestieren. [7,32,97] Die Diagnostik zeigt neben der Visusminderung und ausgeprägten Gesichtsfelddefekten ein oft frühzeitig reduziertes bzw. unterhalb der Nachweisgrenze liegendes Elektroretinogramm (ERG). [7,97] Am Augenhintergrund können sich Knochenkörperchen, Gefäßverengungen, Pigmentepitheldefekte sowie eine Atrophie von Choriokapillaris und Papille entwickeln. [7] Allerdings hängt der Fundusbefund (ebenso wie die übrigen klinischen und diagnostischen Befunde) stark vom jeweiligen genetischen Hintergrund ab, also davon, in welchem Gen bei einem bestimmten Patienten die ursächliche Mutation zu finden ist. [81]

1.2.2. LCA / EOSRD – Genetischer Hintergrund

Als erstes der LCA zu Grunde liegendes Gen konnte im Jahr 1996 *GUCY2D* identifiziert werden. [77] Derzeit (Stand November 2012) sind beim Menschen 23 Gene bekannt, die im Falle einer Mutation zu den klinischen Befunden der LCA führen (s. Tabelle 1-1 und Abbildung 1). (<http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis/>) Am häufigsten betroffen sind dabei *CEP290* (ca. 15 %), *GUCY2D* (ca. 12 %) und *CRB1* (ca. 10 %). [97]

Typ	OMIM	mutiertes Gen (Abkürzung)	mutiertes Gen (voller Name)	Gen-OMIM	Genlocus	Erbgang	Referenz
LCA 1	204000	<i>GUCY2D</i>	<i>Guanylate cyclase 2D</i>	600179	17p13	ar, ad	[77]
LCA 2	204000	<i>RPE65</i>	<i>Retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa</i>	180069	1p31	ar	[34,64]
LCA 3	604232	<i>SPATA7</i>	<i>Spermatogenesis associated 7</i>	609868	14q31.3	ar	[74,98]
LCA 4	604393	<i>AIPL1</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1</i>	604392	17p13.1	ar	[88]
LCA 5	604537	<i>C6ORF152</i>	<i>C6 Open reading frame 152 (Lebercillin)</i>	611408	6q14	ar	[22]
LCA 6	613826	<i>RPGRIP1</i>	<i>Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein</i>	605446	14q11	ar	[25,31]
LCA 7	613829	<i>CRX</i>	<i>Cone-rod homeobox</i>	120970	19q13.3	ad	[29]
LCA 8	613835	<i>CRB1</i>	<i>Crumbs homolog 1</i>	604210	1q31-32.1	ar	[21,59]
LCA 9	608553	<i>NMNAT1</i>	<i>Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1</i>	608700	1p36.22	ar	[15,27, 44,46,76]
LCA 10	204000	<i>CEP290</i>	<i>Centrosomal protein 290 kDa</i>	610142	12q21.3	ar	[23]
LCA 11	204000	<i>IMPDH1</i>	<i>IMP (Inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1</i>	146690	7q31.3	ad	[12]
LCA 12	610612	<i>RD3 (C10RF36)</i>	<i>Retinal degeneration 3</i>	610412	1q32	ar	[30]

LCA 13	612712	<i>RDH12</i>	<i>Retinol dehydrogenase 12</i>	608830	14q23.3	ar	[75]
LCA 14	604863	<i>LRAT</i>	<i>Lecithin retinol acyltransferase</i>	604863	4q31.3	ar	[96]
LCA 15	204000	<i>TULP1</i>	<i>Tubby like protein 1</i>	602280	6p21.3	ar	[33,37,66]
LCA 16	614186	<i>KCNJ13</i>	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13</i>	603208	2q37	ar	[86]
LCA	204000	<i>ALMS1</i>	<i>Alstrom syndrome 1</i>	606844	2p13.1	ar	[99]
LCA	204000	<i>CABP4</i>	<i>Calcium-binding protein 4</i>	608965	11q13.1	ar	[6]
LCA	204000	<i>CNGA3</i>	<i>Cyclic nucleotide-gated channel alpha 3</i>	600053	2q11.2	ar	[99]
LCA	-	<i>IQCB1</i>	<i>IQ motif containing B1</i>	609237	3q21.1	ar	[26,99]
LCA	204000	<i>MyoVIIa</i>	<i>Myosin VIIa</i>	600060	11q13.5	ar	[99]
COD4	613093	<i>PDE6C</i>	<i>Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime</i>	600827	10q24	ar	[95]
MCOPS5	610125	<i>OTX2</i>	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>	600037	14q22.3	ar	[39]

Tabelle 1-1: Betroffene Gene bei LCA-Patienten (<http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis/>)

COD4 = Cone-rod dystrophy 4, MCOPS5 = Microphthalmia syndromic type 5,
OMIM = Online Inheritance Mendelian in Man

Mutationen in diesen 23 Genen sind für etwa 70 % der untersuchten LCA-Fälle verantwortlich; bei den verbleibenden ca. 30 % der Patienten konnten die der Erkrankung zu Grunde liegenden Gene noch nicht identifiziert werden. [58,97]

Für eine ganze Reihe von ursächlichen Mutationen ist es heute möglich, diese mit einem Hybridisierungsassay beim jeweiligen LCA-Patienten nachzuweisen – vorausgesetzt natürlich, dass das betroffene Gen bereits bekannt ist. [81] Jedoch kann der molekulargenetische Arbeitsaufwand dadurch reduziert werden, dass der Phänotyp des einzelnen Patienten bereits gewisse Rückschlüsse auf den möglicherweise zu Grunde liegenden Genotyp liefert. [81,97] So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich

Mutationen in den Genen *CRX*, *GUCY2D*, *RPE65*, *RPGRIP1*, *CRB1* und *LRAT* gerade bezüglich ihrer klinisch-diagnostischen Befunde soweit unterscheiden lassen, dass eine der molekulargenetischen Analyse vorgeschaltete Eingrenzung der Auswahl möglicher Genmutationen in vielen Fällen durchaus möglich und sinnvoll ist. [81] Dies soll die exemplarische Befundauswahl in Tabelle 1-2 anhand einiger charakteristischer Merkmale übersichtsartig verdeutlichen.

Gen	Besonderheiten
<i>GUCY2D</i> (autosomal-rezessiv)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Verlauf</u>: frühe und schwere Form mit träger Pupillenreaktion • <u>Visus</u>: unter 0,1 • <u>Augenhintergrund</u>: unauffällig, auch über lange Jahre keine Veränderungen
<i>GUCY2D</i> (autosomal-dominant)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>ERG</u>: negativ (mit ausgeprägter Zapfenstörung) • <u>Visus</u>: progredienter Verlust bis 0,1 - 0,3 • <u>Augenhintergrund</u>: Makulaveränderung
<i>RPE65</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Fundusautofluoreszenz</u>: fehlend • <u>Visus</u>: relativ gut (um 0,3) in der ersten Lebensdekade, stark beleuchtungsabhängig • absolute <u>Nachtblindheit</u> vom Säuglingsalter an • <u>Augenhintergrund</u>: weitgehend unauffällig
<i>CRB1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Verlauf</u>: früher, schwerer Beginn • <u>OCT</u>: charakteristisch verdickte Netzhaut
<i>CRX</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Augenhintergrund</u>: netzhautweiter Schaden mit lokalen Foci

Tabelle 1-2: Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei LCA-Patienten [81]

Schon diese Auswahl einiger typischer Befunde macht die „klinische Heterogenität“ [81] der einzelnen LCA-Subtypen deutlich. Die klinische Variabilität des Phänotyps der Träger unterschiedlicher Mutationen war auch ausschlaggebend für die Auswahl eines Teils des Patientenkollektivs dieser Arbeit, welches hinsichtlich Mutationen im *RD3*-Gen untersucht wurde (s. 1.4. Zielsetzung).

1.2.3. LCA / EOSRD – Therapieansätze

Netzhautdystrophien wie die LCA / EOSRD galten bisher als nicht kausal therapierbar. [91] Als symptomatische Behandlungsansätze können Brillen mit Kantenfiltergläsern, vergrößernde Sehhilfen und der Hinweis auf eine Selbsthilfegruppe nützlich für die Betroffenen sein. [32] Auch eine psychologische Betreuung der Patienten sowie eine genetische Beratung hinsichtlich der Vererbung der Krankheit an potentielle Nachkommen sind dabei hilfreiche Strategien. [91] Eine kausale Therapie stand jedoch für Patienten mit LCA (ebenso wie für alle anderen von hereditären Netzhautdystrophien Betroffenen) bislang im klinischen Alltag leider noch nicht zur Verfügung. [91] Für die Zukunft verspricht hier die somatische Gentherapie Heilerfolge. [20,28,58,63,81,89-91] Das Grundprinzip dieser Technik besteht in der intrazellulären „Substitution“ des defekten Gens durch eine intakte Kopie desselben. [90] Auf die Methode der somatischen Gentherapie wird im Diskussionsteil (Abschnitt 4.2.) nochmals eingegangen, da Forschungsergebnisse, wie sie sich z. B. aus der vorliegenden Dissertation ergeben, als notwendige Vorarbeiten für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens angesehen werden können.

Daneben ist als weiterer Forschungsansatz zur Therapie von Netzhautdystrophien die Entwicklung von Retinaimplantaten zu nennen, die bereits in der Lage sind, ein gewisses Sehvermögen bei Netzhautpatienten wiederherzustellen. [104](<http://2-sight.eu/en/home-en>)

1.3. Das RD3-Gen

1.3.1. Die Rolle des RD3-Proteins im Phototransduktionszyklus

Aufbau der Netzhaut

Die menschliche Netzhaut (Retina, Tunica interna bulbi) setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: der Neuroretina (Stratum nervosum) und dem retinalen Pigmentepithel (RPE, Stratum pigmenti). [101] Das Stratum nervosum wiederum ist von innen nach außen aus neun Schichten aufgebaut (vgl. Abbildung 1).

Die eigentliche sensorische Funktion der Lichtwahrnehmung übernehmen die Photorezeptoren (Sinneszellen der Netzhaut), also die Stäbchen und Zapfen. Ihre Zellkerne liegen im Stratum nucleare externum, ihre Innen- und Außensegmente im Stratum segmentorum externum et internum. [24] Der Phototransduktionsprozess selbst findet dabei in den Außensegmenten statt. Die übrige Neuroretina dient der Weiterleitung und Verarbeitung der Sinnesinformationen.

Das retinale Pigmentepithel ist über die Interphotorezeptoren-Matrix mit der Neuroretina verbunden. Es übernimmt die Versorgung der Photorezeptoren mit Energieträgern, Sauerstoff und den für den Sehvorgang benötigten Chromophoren. [80]

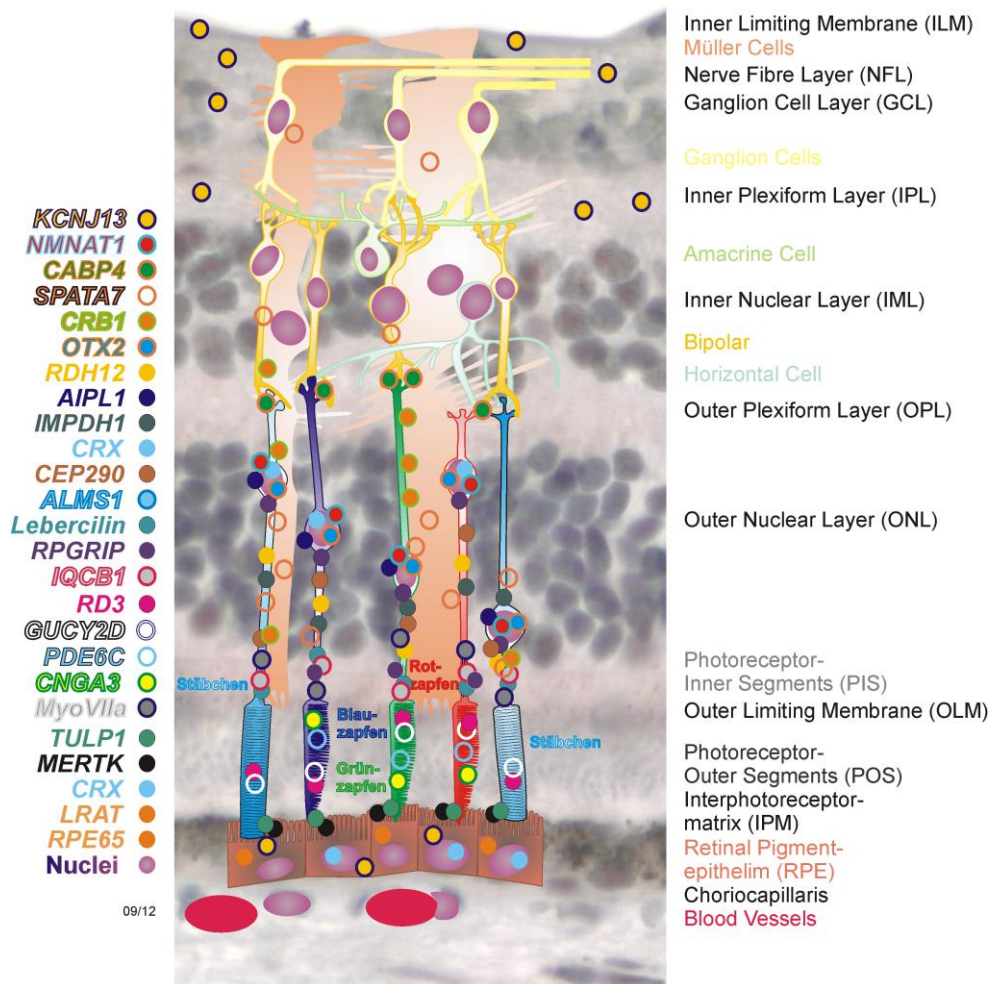


Abbildung 1: Schematisch vereinfachte Darstellung der menschlichen Netzhaut mit Lokalisation der LCA-Gen-Produkte in den verschiedenen retinalen Zelltypen (<http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis>)

Phototransduktionsprozess [8,24,43,57,71,78,80,85]

Die Membran der Photorezeptor-Außensegmente bildet zahlreiche Membraneinfaltungen (bei Zapfen) bzw. Membranstapel (bei Stäbchen), in denen die Sehfarbstoffe eingelagert sind, welche die Lichtwahrnehmung ermöglichen. Stäbchen verwenden als Chromophor das Rhodopsin, bei Zapfen nennt man die Sehpigmente Zapfenopsine. Der Sehfarbstoff besteht aus zwei Komponenten: dem Molekül 11-cis-Retinal und dem Proteinanteil Opsin.

Erreicht ein Lichtquant das Außensegment eines Photorezeptors (vgl. Abbildung 2), findet eine Stereoisomerisation des 11-cis-Retinals zu all-trans-Retinal statt, die dazu führt, dass aus Rhodopsin über verschiedene Zwischenstufen dessen aktive Form Metarhodopsin II entsteht. Dieses ist instabil und zerfällt daher in seine beiden Komponenten. Der Opsinanteil bindet daraufhin an das G-Protein Transducin, welches aus drei Untereinheiten (α , β , γ) aufgebaut ist. Durch diese Wechselwirkung wird an der α -Untereinheit des Transducins ein GDP-Molekül gegen GTP ausgetauscht, worauf sich diese von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ablöst und damit selbst aktiviert ist. Diese aktivierte Form des α -Transducins ist nun in der Lage, inhibitorische γ -Untereinheiten der Phosphodiesterase 6 (PDE6) an sich zu binden. Die auf diese Weise aktivierte Phosphodiesterase 6 baut daraufhin cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat) im Außensegment ab und senkt dadurch den dortigen cGMP-Spiegel. Da cGMP aber benötigt wird, um die membranständigen Kationenkanäle (v. a. für Ca^{2+} und Na^{+}) des Photorezeptors offen zu halten („Dunkelstrom“), kommt es in der Folge des cGMP-Abbaus zu einer Drosselung des Kationeneinstroms und damit zu einer Hyperpolarisation der Sinneszelle. Diese Hyperpolarisation stellt den Erregungszustand des Photorezeptors auf einen adäquaten Reiz dar. Das entsprechende Signal wird sodann auf die nachgeschalteten Bipolarzellen weitergeleitet. Als Transmitter dient dabei Glutamat.

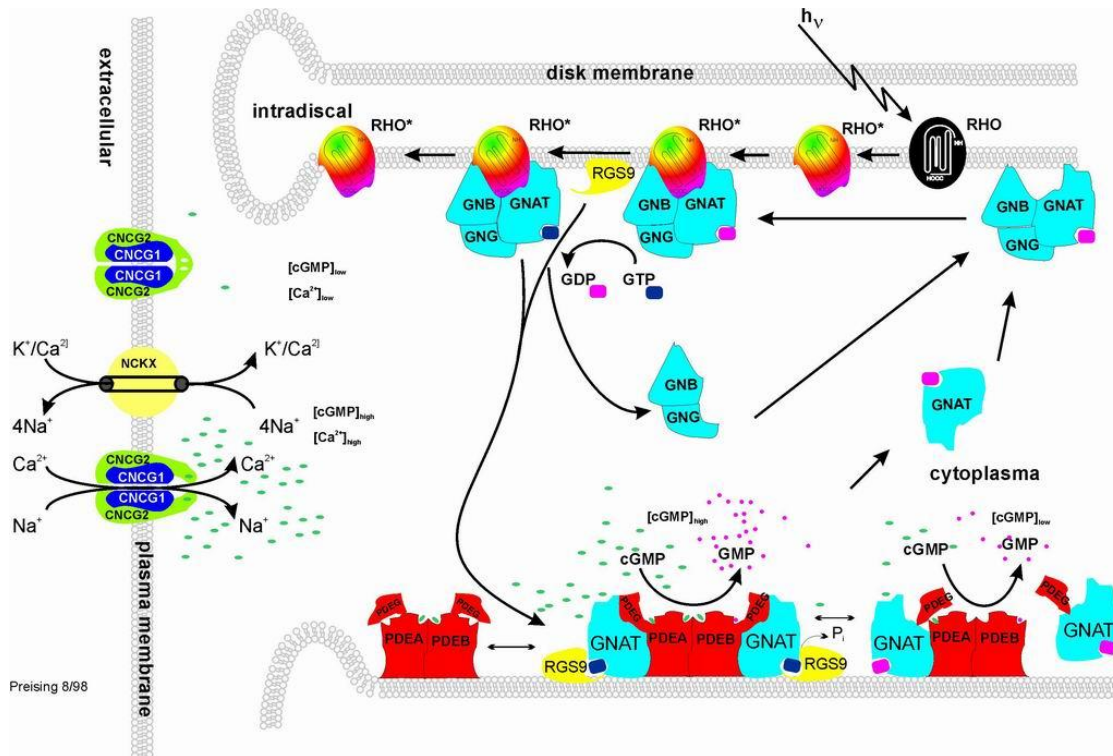


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Phototransduktion in einer Stäbchenzelle (<http://www.retina-international.org/files/sci-news/viscas.htm>)

CNCG1 / CNCG2 = Cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 1/2 (cGMP-gesteuerter Kationenkanal Untereinheit 1/2), cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, GDP = Guanosindiphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, GNAT / GNB / GNG = G-Protein Transducin (α -/ β -/ γ -Untereinheit), NCKX = $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher, PDEA / PDEB / PDEG = Phosphodiesterase 6 (α -/ β -/ γ -Untereinheit), P_i = anorganisches Phosphat, RGS9 = Regulator of G-protein signaling 9 (Guanylatzyklase aktivierendes Protein), RHO = Rhodopsin (mit 11-cis-Retinal), RHO* = aktiviertes Rhodopsin (mit all-trans-Retinal)

Um nach stattgehabtem Lichteinfall und erfolgter Signaltransduktion den Ruhezustand der Sinneszelle wiederherzustellen, muss der cGMP-Spiegel im Außensegment wieder ansteigen und dadurch eine Wiedereröffnung der Kationenkanäle bewirken. Dies geschieht durch folgenden Mechanismus: Die sinkende intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen-Konzentration führt über die Aktivierung der Mediatorproteine GCAP1 und GCAP2 (Guanylyl cyclase activating protein 1 und 2) zu einer Aktivierung der Guanylatzyklase, welche für die Regeneration von cGMP aus GMP sorgt. Sowohl in Stäbchen als auch in Zapfen findet sich die Isoform 1 der Guanylatzyklase (RetGC1), in Stäbchen zusätzlich (zu einem geringen Anteil) die Isoform 2 (RetGC2). Die RetGC1 ist das Produkt des *GUCY2D*-Gens, dessen Mutation die Ursache der LCA Typ 1 darstellt (s. 1.2.2.). Die

RetGC2 wird durch das Gen *GUCY2F* kodiert, dessen Bedeutung allerdings eher untergeordnet zu sein scheint und mit dessen Mutation noch keine Erkrankungen korreliert werden konnten. [8,61]

Nach erfolgter Signaltransduktion müssen auch die verbrauchten Speicher an 11-cis-Retinal wieder aufgefüllt werden. Dies ist v. a. Aufgabe des retinalen Pigmentepithels. Als Ausgangssubstrat dient dabei das all-trans-Retinol, welches aus dem all-trans-Retinal hervorgegangen ist. Zunächst wird das all-trans-Retinol im RPE durch das Enzym Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT) in all-trans-Retinylester überführt. (Mutationen im *LRAT*-Gen führen zur LCA Typ 14. [96]) Die entstandenen all-trans-Retinylester werden zunächst in „Retinosomen“ gespeichert und dann von der Isomerohydrolase (RPE65 = Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa) in 11-cis-Retinol umgewandelt. (Mutationen im *RPE65*-Gen sind die Ursache der LCA Typ 2. [34,64]) Anschließend dient das gewonnene 11-cis-Retinol wiederum als Substrat für die enzymatische Umwandlung in 11-cis-Retinal durch die Retinol-Dehydrogenase 5 (RDH5). Das 11-cis Retinal kann nachfolgend den Photorezeptoren wieder zur Verfügung gestellt werden. [80]

Funktion des RD3-Proteins

Wie oben beispielhaft für *GUCY2D*-, *LRAT*- und *RPE65*-Mutationen dargestellt wurde, konnte bereits für die meisten der bislang bekannten Gene, welche der LCA zu Grunde liegen, die physiologische Funktion ihrer intakten Genprodukte aufgeklärt werden. Für das RD3-Protein (also das Produkt des *RD3*-Gens) wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport der Guanylatzyklase sowie bei der Regulation ihrer Aktivität spielt. [8,78] Die grundlegenden Erkenntnisse darüber gehen auf Arbeiten von Azadi et. al und Peshenko et al. zurück. [8,78] Die Kernaussagen dieser Arbeiten zu Lokalisation und Funktion des RD3-Proteins sind im Folgenden zusammengefasst [8,78]:

1. Physiologische Lokalisation des RD3-Proteins:

Durch immunhistochemische Färbung von Netzhautschnitten gesunder Mäuse mit RD3-spezifischen Antikörpern ließ sich zeigen, dass das RD3-Protein im

Außensegment der Photorezeptoren, dagegen jedoch kaum im Innensegment oder im Synapsenbereich zu finden ist. [8] Diese Beobachtung wird auch durch Ergebnisse früherer Versuche gestützt, die das Vorkommen des RD3-Proteins im Außensegment mittels Massenspektrometrie-basierter Proteomanalyse nachweisen konnten. [49]

2. Interaktion des RD3-Proteins mit der retinalen Guanylatzyklase (RetGC):

Mittels Koimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die retinalen Guanylatzyklasen 1 und 2 (RetGC1 und RetGC2) mit dem RD3-Protein interagieren. Ein Experiment, bei dem eine Lösung verschiedener retinaler Proteine durch eine mit RD3-Antikörpern markierte Sepharose-Säule geschleust und anschließend eine Analyse des Präzipitats mittels Massenspektrometrie bzw. Westernblot durchgeführt wurde, konnte die gemeinsame Ausfällung von RetGC1 bzw. RetGC2 und RD3 zeigen. [8] Weitere Experimente, bei denen eine Koexpression von RD3 und RetGC1 in HEK293T-Zellen durchgeführt wurde, bestätigten, dass beide Proteine koimmunpräzipitieren und daher vermutlich direkt miteinander interagieren. [8] Die Expression verschiedener RetGC1-Mutanten zusammen mit RD3 in HEK293T-Zellen ergab daraufhin, dass eine kurze C-terminale Domäne von RetGC1 für die Bindung an das RD3-Protein zuständig ist. [8]

3. Auswirkungen eines RD3-Mangels bei Mäusen:

Während RetGC1 und RetGC2 immunhistochemisch in den Außensegmenten gesunder Mäuse nachgewiesen werden konnten, fehlten diese bei Mausmutanten ohne funktionsfähiges RD3-Protein (sogenannte *rd3*-Mäuse, s. 1.3.2.). Auch durch Westernblots von Retinaextrakten konnte dargelegt werden, dass die Abwesenheit von RD3 (bei *rd3*-Mäusen) zu einem Mangel an RetGC führt. [8] Mittels RT-PCR konnte ferner nachgewiesen werden, dass das Expressionsniveau des RetGC1-Proteins bei Wildtyp- und *rd3*-Mäusen ähnlich ist. Das *rd3*-bedingte Fehlen von RetGC1 im Außensegment ist somit auf eine Störung der Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen. [8]

4. Mutmaßliche Funktion des RD3-Proteins beim Transport der RetGC:

Expressionsanalysen von RD3 und RetGC1 in COS7-Zellen ergaben:

- RD3 – separat exprimiert – findet sich in intrazellulären Vesikeln (Kokalisation mit Rab11, einem Vesikel-Marker). [8]

- GC1 – separat exprimiert – findet sich im endoplasmatischen Retikulum (Kokalisation mit Kalnexin, einem ER-Marker). [8]
- Werden die beiden Proteine aber zusammen exprimiert, zeigt sich, dass RetGC1 vom ER in die RD3-enhaltenden Vesikel überführt wird. Das legt nahe, dass das RD3-Protein für diesen Export von GC1 mitverantwortlich ist (s. Abbildung 3). [8]

5. Regulatorische Effekte des RD3-Proteins auf die Aktivität der RetGC:

- Zum einen konnte experimentell eine nicht-kompetitive Hemmung der enzymatischen Basisaktivität der Guanylatzyklase in Abwesenheit von GCAPs nachgewiesen werden. [78]
- Zum anderen ließ sich darüber hinaus aber auch eine kompetitive Inhibition der GCAP-stimulierten Aktivität der RetGC bei niedrigen Calcium-Spiegeln zeigen. [78]

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse postulierten Peshenko et al., dass das RD3-Protein für die Hemmung der Guanylatzyklase im Innensegment sowie während ihres Transportes ins Außensegment verantwortlich ist (s. Abbildung 3). [78]

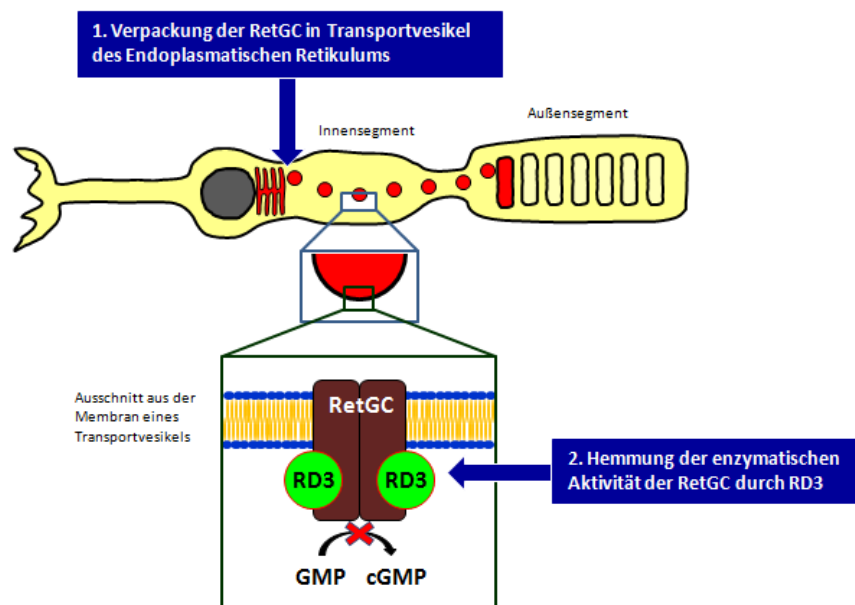


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion des RD3-Proteins in einer Photorezeptorzelle

Alle diese Vorstellungen über die Wechselwirkungen zwischen RD3-Protein und Guanylatzyklase waren die Grundlage für weiterführende Überlegungen in diese Richtung, die in der vorliegenden Arbeit angestellt wurden. Einige der Gedanken werden daher im Diskussionsteil nochmals aufgegriffen (vgl. 4.1.3).

1.3.2. Mutationen im *rd3*-Gen der Maus

Im Jahre 1969 wurden im Schweizer Valposchiavo (Kanton Graubünden) Mäuse eingefangen, die wegen ihrer Fellfarbe zunächst als „tobacco mice“ bezeichnet wurden. Einige Exemplare dieses Stammes gelangten schließlich über Dr. Muriel T. Davisson ins Jackson Laboratory in den USA, wo sie unter dem Namen RBF/DnJ (RBF = Robertsonian, subline POSF; DnJ = Davisson, Jackson Laboratory) geführt werden, um ihre Robertsonschen Translokationen – Rb(1.3)1Bnr, Rb(8.12)5Bnr und Rb(9.14)6Bnr – zu konservieren. [30] (<http://jaxmice.jax.org/strain/000726.html>) Von besonderem Interesse für die Augenheilkunde ist die Tatsache, dass diese Mäuse an einer hereditären Netzhautdystrophie mit autosomal-rezessivem Erbgang leiden. Als solche stellen sie hervorragende Modelle zur Erforschung (patho)physiologischer Mechanismen und zur Identifikation beteiligter Gene bei Netzhautentwicklung und Netzhautdegenerationen des Menschen dar. [14]

Bei den RBF/DnJ-Mäusen vollzieht sich die Entwicklung der Retina in den ersten beiden Lebenswochen noch wie bei Wildtyp-Mäusen. Ab der dritten Woche kommt es dann allerdings zu einer progredienten Reduktion der Sinneszellen samt der zugehörigen äußeren Körnerschicht, die bis zum Verschwinden aller Photorezeptoren in der achten Woche voranschreitet. Parallel zu dieser histologischen Entwicklung lassen sich eine Amplitudenabnahme im Elektroretinogramm und degenerative Veränderungen der Blutgefäße und der Papille am Augenhintergrund beobachten. Durch Kopplungsanalyse konnte die Lokalisation des für die Erkrankung ursächlichen *Rd3*-Gens zunächst auf einen 5 cM großen Bereich auf dem murinen Chromosom 1 eingegrenzt werden. [14] Nach weiteren Vorarbeiten [17] gelang es dann Jahre später, den exakten Genlocus (3322402L07Rik) von *Rd3* zu identifizieren. [30] Durch Sequenzierung und Vergleich der Basenfolge mit dem Gen gesunder Wildtyp-Mäuse konnte auch die krankheitsverursachende Mutation in *Rd3* nachgewiesen werden. Sie führt an Position 319 in Exon 3 des Gens zu einem Austausch von Cytosin gegen Thymin. Das folglich verän-

derte Codon 107 wiederum bewirkt, dass bei der Translation an dieser Stelle statt dem physiologischerweise dort eingebauten Arginin nun ein Stoppcodon gesetzt wird. Dadurch kommt es zu einem Abbruch der Proteinsynthese nach Position 106 und somit zu einer Verkürzung des eigentlich 195 Aminosäuren großen Proteins. In COS1-Zellen, die dieses verkleinerte und dysfunktionale RD3-Protein exprimieren, zeigt es sich instabil und unterliegt einem schnellen Abbau. [30]

Bereits im Rahmen dieser und weiterer Untersuchungen fiel auf, dass die histologischen und elektrophysiologischen Befunde nicht bei allen *rd3*-Mäusen identisch waren, sondern zwischen verschiedenen durch Zucht entstandenen Unterstämmen variierten. [30,38,55] Danciger et al. beschrieben 2008 genetische „Modifier“ als konkrete Ursachen für die phänotypische Heterogenität von *rd3*-Mäusen. [18] Sie verwendeten dazu zwei Mausstämme (BALB, B6a), deren unterschiedlicher genetischer Hintergrund Einfluss auf die phänotypische Entwicklung bei Licht-induzierter und altersabhängiger Netzhautdegeneration hatte. Für beide Stämme wurden durch entsprechende Kreuzungsexperimente Linien gezüchtet, deren Individuen jeweils homozygote Träger für *rd3* waren (BALB-*rd3/rd3* bzw. B6a-*rd3/rd3*). Durch histologischen Vergleich der Dicke der äußeren Körnerschicht (als Ausdruck des Überlebens der Photorezeptoren) im Alter von 5 bis 12 Wochen konnte gezeigt werden, dass die retinale Degeneration bei den BALB-Mäusen relativ zu den B6a-Mäusen schneller voranschreitet, obwohl beide Linien – wie beschrieben – hinsichtlich ihres *Rd3*-Gen-Status identisch waren. Die Suche nach Bereichen innerhalb des Maus-Genoms, in denen die für die gefundene phänotypische Variabilität verantwortlichen Gene zu finden sind (sog. QTLs = quantitative trait loci), erbrachte u. a. Regionen auf den Chromosomen 5, 8, 14 und 17, die einen Einfluss auf den Verlauf der Degeneration ausüben. Eine Charakterisierung konkreter Gene innerhalb dieser gefundenen Abschnitte steht noch aus. [18]

1.3.3. Mutationen im RD3-Gen des Hundes

Auch bei verschiedenen Hunderassen ist eine Vielzahl erblicher Netzhautdegenerationen bekannt. [1,4,47,48,84,102,103] Eine davon ist die Stäbchen-Zapfen-Dysplasie Typ 2 (Rod-cone dysplasia type 2 = *rcd2*). Es handelt sich dabei um eine autosomal-rezessive Erbkrankheit bei lang- und kurzhaarigen Collies. [47,102]

Bereits 1978 wurde das klinische Bild betroffener Collie-Welpen als eine mit ca. sechs Wochen auftretende Nachtblindheit beschrieben, die sich bis zu einem Alter von sechs bis acht Monaten zu funktioneller Blindheit weiterentwickelt. [102] Das Elektoretinogramm der untersuchten Tiere mit *rcd2* zeigte bereits nach 16 Wochen sowohl unter skotopischen als auch unter photopischen Bedingungen deutlich reduzierte Amplituden. [103] Dass es sich bei *rcd2* um eine eigenständige Krankheitsentität mit einem dazugehörigen Gendefekt handelt, konnte durch Kreuzungsexperimente gezeigt werden, in denen ein betroffener Collie mit einem Hund verpaart wurde, der heterozygoter Träger der Erbinformation zweier weiterer autosomal-rezessiver caniner Netzhautdegenerationen war: *rcd1* (rod-cone dysplasia type 1) und *erd* (early retinal degeneration). Alle Nachkommen in diesem Wurf erwiesen sich als phänotypisch unauffällig, was darlegt, dass die verantwortlichen Gene für *rcd1*, *rcd2* und *erd* nicht-allelisch vererbt werden. [4]

Nachdem eine vorangegangene Untersuchung das für die Stäbchen-Zapfen-Dystrophie Typ 2 (*rcd2*) verantwortliche Gen bereits auf die Region CFA7 eingegrenzt hatte [48], konnte die Zahl der Kandidatengene 2009 durch weitere Kopplungsanalysen auf drei eingegrenzt werden: *TRAF5*, *C1orf36* und *SLC30A1*. Letztendlich erwies sich von diesen das *C1orf36*-Gen als verantwortlich für die Entwicklung von *rcd2* bei Collies. Als ursächliche Mutation konnte eine Insertion von 22 Basenpaaren identifiziert werden, die zu einer Veränderung des ursprünglichen Leserahmens und damit zur Synthese eines in seiner Funktion beeinträchtigten Proteins führt. Das Gen *C1orf36* kommt auch bei anderen Spezies vor und spielt dort ebenfalls eine Rolle im Rahmen degenerativer Netzhauterkrankungen: Es ist das Gen, dessen Mutation für die retinale Dystrophie *rd3* bei Mäusen und für die LCA Typ 12 beim Menschen verantwortlich ist. [47]

1.3.4. Mutationen im *RD3*-Gen des Menschen

Das humane *RD3*-Gen wurde erstmals im Jahre 2003 von Lavorgna et al. [51] beschrieben, damals noch unter dem Namen *C1orf36* (Chromosome 1 open reading frame 36). Auf der rechnergestützten Suche nach netzhautspezifisch exprimierten Genen als mögliche Kandidaten für Netzhautdegenerationsformen, deren Ursache bislang noch nicht beschrieben war, identifizierte die Arbeitsgruppe zunächst die entsprechende cDNA.

Aus dieser konnte nachfolgend das Transkript von *Clorf36* rekonstruiert werden, welches für ein 195 Aminosäuren großes Protein kodiert. Das zugehörige Gen besteht aus 3 Exons. Es konnte dem Locus 1q32.3 zugeordnet werden.

Im Jahre 2006 gelang Friedman et al. die erste Beschreibung von LCA-Patienten mit zu Grunde liegender *RD3*-Mutation. Im Rahmen eines großangelegten Mutationscreenings konnten zwei Geschwister indischer Abstammung identifiziert werden, deren Mutation (c.296+1G→A) bei 121 Kontrollindividuen nicht nachgewiesen werden konnte. Die Homozygotie dieser Mutation ging dabei mit dem Auftreten von LCA bei betroffenen Familienmitgliedern einher, während sich die heterozygoten Träger innerhalb dieser Familie phänotypisch unauffällig präsentierten. Auf molekularer Ebene führt diese Veränderung der Basensequenz vermutlich über die Entstehung eines Stoppcodons an Position 100 zum vorzeitigen Abbruch der Biosynthese des RD3-Proteins, was dessen Funktionsverlust zur Folge hat. Die beiden erkrankten Geschwister wurden klinisch folgendermaßen charakterisiert: „von Geburt an niedriger Visus, Nystagmus und atrophische Läsionen mit Pigmentverschiebungen im Makulabereich“ [30]. Sie stellen die weltweit ersten beschriebenen LCA-Patienten mit zu Grunde liegender *RD3*-Mutation dar. [30]

In einer der hier vorgelegten Arbeit vorausgehenden Kopplungsstudie gelang der Arbeitsgruppe des Labors für Molekulare Ophthalmologie an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig Universität Gießen 2010 die Identifizierung einer zweiten Familie, in der eine *RD3*-Mutation die Ursache einer Leberschen kongenitalen Amaurose darstellt. [79] Dabei handelt es sich um eine konsanguine Großfamilie kurdischer Abstammung. Vier der an LCA erkrankten Geschwister, die sich zwischen 1989 und 2010 im Alter von 3 Monaten bis 21 Jahren wiederholt zu Untersuchungen in der Universitätsaugenklinik Gießen vorstellten, konnten dabei als Träger der *RD3*-Mutation beschrieben werden. Nachdem potentiell ursächliche Mutationen in verschiedenen anderen LCA-Genen ausgeschlossen werden konnten, wurde der chromosomale Locus des verantwortlichen Gens zunächst mittels Kopplungsanalyse eingegrenzt. Durch anschließende Sequenzierung konnte bei allen vier Patienten eine homozygote Stoppmutation (c.180C>A) als Ursache ihrer LCA identifiziert werden. Diese Mutation konnte daraufhin auch bei zwei weiteren betroffenen Familienmitgliedern nachgewiesen werden.

Zu den sechs identifizierten *RD3*-Patienten liegen umfangreiche ophthalmologische Daten vor, die u. a. Informationen zu Visus, Elektroretinogramm, Pupillenreaktion, Nystagmus und Refraktion beinhalten. [79] Basierend auf den bisherigen Befunden kann der aus der gefundenen Mutation im *RD3*-Gen resultierende Phänotyp dieser Patientengruppe zusammenfassend folgendermaßen charakterisiert werden: *RD3*-Mutationen verursachen eine extrem schwere Form von frühkindlicher Netzhautdystrophie. Es bestehen ein kongenitaler Nystagmus und eine ausgeprägte Blendungsempfindlichkeit, die durch Kantenfiltergläser gemildert werden kann. Die Pupillenreaktion bleibt hingegen auch im Verlauf intakt. Der Visus (BCVA = best corrected visual acuity) übersteigt nie die Grenze von 0,08 (logMAR \geq 1,12), gemessen mit Teller Acuity Cards (TAC), bzw. 0,05 (logMAR \geq 1,3), gemessen mit LH-Lesetafeln oder Snellen-Haken. Mit dem Voranschreiten der Erkrankung reduziert sich die Sehschärfe weiter bis auf Lichtwahrnehmung. Die Refraktion der Betroffenen ändert sich dabei im Verlauf von zunächst hyperopen zu später myopen Messwerten. Hinzu kommen ein herabgesetztes Farbsehvermögen und – solange überhaupt messbar – eine hochgradige und progressive konzentrische Einengung des Goldmann-Gesichtsfeldes. Der Fundus präsentiert sich anfangs bis zu einem Alter von ca. 2 Jahren unauffällig, danach zeigen sich verengte Gefäße, ein Verlust des Makula-Wallreflexes und Bull's-Eye-Läsionen im Makulabereich mit zentralem gelbem Pigment, welches sich später im Jugendalter zu einer gelblichen Punktierung wandelt. Im weiteren Verlauf entwickelt sich ferner ein „gehämmert“ erscheinendes Bild des Augenhintergrundes sowie periphere Pigmentverschiebungen im Sinne von Knochenkörperchen. Bei allen elektroretinographischen Messungen (ERG, durchgeführt im Alter von 5 bis 10 Jahren) liegen die Antworten charakteristischerweise unterhalb der Nachweisgrenze. In der optischen Kohärenztomographie (OCT) stellt sich die Netzhaut der Betroffenen verdünnt und desorganisiert dar. [79]

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Aussage zur Häufigkeit von *RD3*-Mutationen als Ursache von frühkindlichen und juvenilen Netzhautdegenerationen zu treffen. Dazu wurden 88 Patienten mit hereditären Netzhautdystrophien aus der DNA-Datenbank der Universitätsaugenklinik Gießen ausgewählt und deren DNA-Proben auf Mutationen im *RD3*-Gen untersucht. Ausschlaggebend für den Einschluss in die Studie war zum einen – in der Annahme einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation – die phänotypische Ähnlichkeit der Patienten mit bereits beschriebenen *RD3*-Patienten (Patientengruppe 1) und zum anderen – in der Annahme eines möglichen genetischen Modifyings – das bereits nachgewiesene Vorliegen von Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (Patientengruppe 2).

2. Material und Methoden

2.1. Methodischer Überblick

Zur Vervielfältigung des *RD3*-Gens in den DNA-Proben der 88 darstellten Patienten wurde zunächst eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Das amplifizierte Produkt wurde anschließend auf ein Agarosegel übertragen und dort elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande im Gel, in welcher die mit Ethidiumbromid markierte *RD3*-DNA enthalten war, wurde durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und dann ausgestochen. Nach Aufreinigung der im Gelblock enthaltenen DNA wurde diese zur Sequenzierung an ein externes Labor weitergeleitet. Auf der Grundlage der so ermittelten Sequenz konnten dann durch Vergleich mit der Basenfolge bei gesunden Personen etwaige Veränderungen im *RD3*-Gen der untersuchten Patienten identifiziert werden.

2.2. Patienten

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten DNA-Proben stammten aus dem Bestand des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die 88 Personen, denen diese DNA-Proben zuvor entnommen wurden, waren zum überwiegenden Teil Patienten der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig Universität Gießen bzw. der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg. Von einigen wenigen Patienten wurden DNA-Proben verwendet, die dem Labor von externen Untersuchern zur genetischen Diagnostik zugesandt worden waren. Die Kandidaten für das Mutationsscreening wurden dabei individuell nach klinisch-diagnostischen bzw. genetischen Befunden, die aus ihren Krankenblättern hervorgingen, ausgewählt. Die Eingangsdiagnosen, unter denen die jeweiligen Fälle in der DNA-Datenbank geführt wurden, waren überwiegend Lebersche kongenitale Amaurose (LCA), Frühkindliche schwere Netzhautdystrophie (EOSRD), Retinopathia pigmentosa (RP), Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD), Stäbchen-Zapfen-Dystrophie (RCD) und Zapfendystrophie (COD). Alle Patienten wurden gemäß der Deklaration von Helsinki behandelt und entsprechend aufgeklärt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen lag vor (Antragsnummer 149/07).

2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.3.1. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Mikropipetten	Transferpette S	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
	Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Schüttler	Vortex Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt
Tischzentrifuge	Minizentrifuge MCF-2360	LMS, Tokio, Japan
Thermocycler	T Personal	Biometra GmbH, Göttingen
	T Professional Basic	Biometra GmbH, Göttingen
	T Professional Basic Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
Waage	Pioneer	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Gelelektrophorese- kammer (horizontal) für Agarose-Gele	Compact M	Biometra GmbH, Göttingen
Spannungsgeräte	Power Pack P25T	Biometra GmbH, Göttingen
	Whatman PS305T	Biometra GmbH, Göttingen
UV-Illuminator	BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
Blockthermostat	TB2 Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Tischkühlzentrifuge	1-15 PK	Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 2-1: Geräte

2.3.2. Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Bestell-Nr.	Hersteller
Agarose Seakem LE	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	840004	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	8.02912.1000	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Ethanol	C_2H_6O	K 928.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	E 8751	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Ethylendiamin- tetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	8043.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	NaOH	6771.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 2-2: Chemikalien

2.3.3. Stammlösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		
dNTP-Lösung 1,25 mM	dNTP	Bestell-Nr.	Hersteller
	dATP 100 mM	RO142	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	dCTP 100 mM	RO152	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	dGTP 100 mM	RO162	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	dTTP 100 mM	RO172	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	jeweils 12,5 µl pro dNTP auf 950 µl ddH ₂ O		
Ethidiumbromid-Lösung	1% w/v in ddH ₂ O		

Magnesiumchlorid-Lösung 25 mM	gebrauchsfertige Lösung des Herstellers (Promega, Mannheim; Bestell-Nr. A351H)
5x Green GoTaq Flexi Buffer	gebrauchsfertige Lösung des Herstellers (Promega, Mannheim; Bestell-Nr. M891A)
10x TBE	108 g TRIS → 0,89 M 55 g EDTA-Na ₂ → 0,02 M 7 g Borsäure → 0,89 M mit ddH ₂ O auf 1 Liter aufgefüllt (pH 8,0)

Tabelle 2-3: Stammlösungen

2.3.4. Enzyme

Enzym	Bestell-Nr.	Hersteller
GoTaq DNA-Polymerase 5U/μl	M830B	Promega GmbH, Mannheim

Tabelle 2-4: Enzyme

2.3.5. Kits

Kit zur DNA-Aufreinigung	Bestell-Nr.	Hersteller
NucleoSpin Extract II (Gel and PCR Clean-up)	740609.250	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Tabelle 2-5: Kits

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Gewinnung der DNA-Proben

Bei den Patienten, deren *RD3*-Gen im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Mutationen untersucht werden sollte, war (bereits im Vorfeld dieser Arbeit und unabhängig von dieser) peripher-venöses Blut entnommen oder alternativ ein Abstrich der Mundschleimhaut durchgeführt worden. Aus den in diesem Untersuchungsmaterial (Vollblut bzw. Mundschleimhautabstrich) vorhandenen Zellen war die enthaltene DNA extrahiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt worden. Auf dieses von anderer Seite zusammengetragene DNA-Material konnte im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation zurückgegriffen werden.

2.4.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) [41,56,57,68,82]

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine seit ihrer Veröffentlichung im Jahre 1984 überaus bewährte und weltweit verbreitete Methode zur gezielten in vitro-Amplifikation von DNA-Fragmenten. Für ihre Entwicklung wurde der US-amerikanische Biochemiker Kary Banks Mullis 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Komponenten eines PCR-Ansatzes

Ein PCR-Ansatz enthält folgende Komponenten:

- die DNA-Doppelhelix, welche die zu vervielfältigende Sequenz enthält
- eine DNA-Polymerase, welche die Synthese der DNA-Kopien vornimmt (Da während eines PCR-Zyklus Temperaturen bis über 90 °C erreicht werden, bei denen herkömmliche Enzyme bereits längst denaturiert würden, muss hierfür eine spezielle DNA-Polymerase eingesetzt werden, die diesen extremen Bedingungen standhält. Man gewinnt diese Polymerase z. B. aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* und nennt sie dann Taq-Polymerase.)
- zwei abschnittsspezifische synthetische Oligonukleotide, sogenannte Primer (Diese sind komplementär zum 5'-Ende des Gegenstranges (Forward Primer)

bzw. zum 5'-Ende des kodierenden Stranges (Reverse Primer) und rahmen somit den interessierenden DNA-Abschnitt von beiden Seiten her ein. Sie werden von der DNA-Polymerase für den Synthesestart benötigt.)

- ein Gemisch aus Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die als Bausteine für die neu zu bildende DNA dienen
- Magnesiumchlorid als Kofaktor der DNA-Polymerase
- DMSO zum Auflösen von Sekundärstrukturen der DNA
- doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)
- ein Reaktionspuffer (der hier Bestandteil des Enzymkits war).

Aus Primern, Polymerase, Desoxyribonukleotiden, Magnesiumchlorid, DMSO und Pufferlösung wird zunächst ein sogenannter „Mastermix“ angesetzt. Diese Stammlösung kann anschließend als identische Grundlage für mehrere DNA-Proben genutzt werden.

Bei der vorliegenden Arbeit setzte sich der PCR-Ansatz für eine Patienten-DNA-Probe folgendermaßen zusammen:

Reagenz	Menge [µl] für Exon RD3-2	Menge [µl] für Exon RD3-3
Patienten-DNA (20 ng/µl)	10	10
GoTaq DNA-Polymerase (5U/µl)	0,2	0,2
Forward Primer (10 mM)	2	1
Reverse Primer (10 mM)	2	1
dNTP (1,25 mM)	8	8
MgCl ₂ (25 mM)	6	6
DMSO	2	2
5x Green GoTaq Flexi Buffer	10	10
ddH ₂ O	10	12
Gesamtansatz	50,2	50,2

Tabelle 2-6: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Folgende Primer wurden verwendet:

für Exon RD3-2 (Produkt: 466 bp):	
Forward Primer	CTCTCCTGGGTCCCAGCTCT
Reverse Primer	AGCCACCTTTCCTGGAGCCT
für Exon RD3-3 (Produkt 496 bp):	
Forward Primer	TGAAGCAGTAGCAGCGTGGG
Reverse Primer	CTGCAGAAGGCTCCGCTTCT

Tabelle 2-7: Primerpaare für die Exons 2 und 3 des *RD3*-Gens

Diese Primer wurden (bereits im Vorfeld dieser Dissertation) nach GenBank record NG_013042.1 gestaltet. Dabei wurde die Software „Vector NTI 11“ (Invitrogen, Darmstadt) verwendet.

Ablauf einer PCR

Bei einer PCR werden im Rahmen einer Kettenreaktion definierte DNA-Abschnitte vervielfältigt, indem eine DNA-Polymerase wiederholt komplementäre Stränge zu einer vorliegenden spezifischen DNA-Sequenz (Template) synthetisiert. Durch die im Verlauf der Reaktion ständig wachsende Zahl an Kopien, die wiederum selbst als Vorlage für weitere Verdopplungen dienen, steigt die Zahl an replizierten DNA-Abschriften exponentiell. Der Basisprozess dieser Kettenreaktion, der sich im Rahmen eines PCR-Durchlaufes ständig wiederholt, lässt sich im Wesentlichen in drei Schritte untergliedern:

1. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang, auf dem sich der zu amplifizierende Genomabschnitt befindet, durch Erhitzen auf 94 °C in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Denaturierung oder auch Schmelzen (engl. melting) der DNA.
2. Danach wird auf die Annealingtemperatur (ca. 60 °C) abgesenkt, was zur Anlagerung (engl. annealing) der im Reaktionsansatz enthaltenen spezifischen Primer führt. Diese Temperatur ist für jedes Primerpaar zu optimieren.

3. Bei einem Temperaturoptimum von nun 72 °C findet anschließend der eigentliche Syntheseprozess der jeweils komplementären Stränge durch eine DNA-Polymerase statt.

Nach Ablauf dieser drei Schritte wird der Zyklus 35-mal wiederholt, was wie oben beschrieben zu einer exponentiellen Vervielfältigung der von den Primern eingerahmten DNA-Sequenz führt. Dieser Vorgang erfolgt dabei vollautomatisiert in Thermocyclern, die ca. 1,5 bis 2 Stunden für eine PCR benötigen.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden für den PCR-Ablauf folgende Bedingungen gewählt:

Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	
Start	94	5	
Annealing (Primeranlagerung)	65	1	} 35 Zyklen
Extension (Synthese)	72	1	
Melting (Denaturierung)	94	1	
Annealing (Primeranlagerung)	65	1	
Extension (Synthese)	72	10	

Tabelle 2-8: Ablauf einer PCR

2.4.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung eines Gemisches von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge können elektrophoretische Verfahren eingesetzt werden, bei denen als Matrix Agarose-Gele verwendet werden. [5] Agarose ist ein Polysaccharid, welches aus Meeresalgen gewonnen wird und dessen Galaktose-Einheiten beim Gelieren zu einer inerten, siebartig wirkenden Substanz polymerisieren. [41,60,100] Ein höher konzentriertes Gel bildet dabei engmaschigere Poren als ein niedriger konzentriertes, wobei gilt: Je kleiner die Poren des Gels, desto kürzere DNA-Fragmente können damit aufgetrennt werden und umgekehrt. [41] Die auf Grund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-

Moleküle wandern innerhalb des Gels entlang einer angelegten elektrischen Spannung auf den Pluspol zu. [100] Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fragmente hängt dabei v. a. von ihrer Kettenlänge ab (neben anderen Faktoren wie z. B. Gelkonzentration, DNA-Konformation und Höhe der angelegten Spannung). [60] Je kürzer das DNA-Molekül ist, desto leichter kann es durch die Poren des Gels wandern. Moleküle gleicher Größe (und damit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit) sammeln sich folglich als Banden auf gleicher Höhe. [100] Zur Skalierung der Laufstrecke entsprechend der Größe der Fragmente werden stets Gemische von DNA-Molekülen definierter Größe (Größenstandards, „DNA-Leitern“) mit aufgetrennt, was eine Größenbestimmung der untersuchten DNA-Moleküle ermöglicht. [41]

Um diese Banden anschließend sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel vor der Elektrophorese der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid kann durch UV-Licht der Wellenlängen 254 nm, 302 nm oder 366 nm angeregt werden und strahlt dann ein orange-rotes Licht im Wellenlängenbereich von 500 nm bis 590 nm ab. [41] Die planaren Ethidiumbromid-Moleküle haben die Eigenschaft, sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einzulagern (Interkalation), sodass sie sich im Bereich der DNA-Banden anreichern. Durch diese Anreicherung kommt es zu einer Verstärkung der Fluoreszenz um den Faktor 50 bis 100 in den Banden, wodurch diese sichtbar werden. [60]

In dieser Arbeit wurden zur Auftrennung der mittels PCR amplifizierten DNA-Proben 2%-ige Agarose-Gele mittlerer Größe (12,4 cm x 14,5 cm) verwendet. Zur Herstellung eines solchen Gels wurden 2,4 g Agarose (Agarose Seakem LE der Firma Biozym) abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben mit 1xTBE-Puffer auf 120 g aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch solange vorsichtig in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte, was daran zu erkennen war, dass sich eine klare, homogene Flüssigkeit gebildet hatte. Während des Erhitzungsvorgangs verdunstetes Lösungsmittel wurde im Anschluss durch entsprechende Zugabe von doppelt destilliertem Wasser ergänzt. Nach Zusatz von 8 µl 1% Ethidiumbromid-Lösung konnte sich das Gel unter ständigem Rühren bis auf ca. 40 °C abkühlen, bevor es zur Aushärtung in die dafür vorgesehene Form gegossen wurde. Die Aussparungen im Gel, welche später zur Aufnahme der DNA-Proben dienen sollten (Slots), wurden dabei durch Platzhalter (Kämme) freigehalten. Nach Lagerung über 20 Minuten im Kühlschrank (4 °C) hatte sich das flüssige Gemisch soweit abgekühlt, dass sich daraus ein formstabiles Gel

gebildet hatte. Dieses wurde in die Elektrophoresekammer (Compact M, Biometra) überführt und dort mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die einzelnen Slots wurden anschließend mit jeweils 50 µl PCR-Ansatz befüllt. Als Größenstandard zur Skalierung der Laufstrecke wurde eine 100 bp-DNA-Leiter mit aufgetrennt. Nach Abschluss der Befüllung wurde an die in den Elektrophoresekammern liegenden Gele eine Spannung von 100 Volt angelegt und über 60 Minuten aufrecht erhalten. Um nach Ablauf der 60 Minuten die Diffusion der DNA aus den gebildeten Banden in das umliegende Gel zu vermindern, wurde nach Beendigung der Auftrennungsphase eine geringe Grundspannung von ca. 1 Volt beibehalten (Gel Saver).

Das Gel wurde nun aus der Elektrophoresekammer entnommen. Bei Betrachtung im UV-Licht (UV-Illuminator BioDocAnalyse, Biometra) wurden die mit Ethidiumbromid markierten DNA-Banden dokumentiert und gezielt ausgestochen. Die so gewonnenen Gel-Blöckchen wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

2.4.4. Aufreinigung des PCR-Produkts für die Sequenzierung

Zur Aufreinigung der in den Gel-Blöckchen enthaltenen DNA für die Sequenzierung wurde das Kit NucleoSpin[®] Extract II der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden 250 µl Bindungspuffer (Binding Buffer NTI) zu den Gel-Blöckchen hinzugegeben. Durch 10-minütiges Erhitzen des Ansatzes im Thermoblock (50 °C) und wiederholtes Durchmischen mit dem Vortex-Schüttler wurde der Gel-Block vollständig gelöst. Die Probe wurde anschließend auf eine Silica-Gel-Aufreinigungssäule (NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Column) überführt und für 90 Sekunden bei Raumtemperatur mit 11.000 g zentrifugiert. Beim Durchwandern der Säule wurde die enthaltene DNA an das Säulenmaterial gebunden; der sich im darunter befindlichen Sammelröhrchen aufgefangene Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin wurde die Silica-Säule durch Zugabe von 700 µl Waschpuffer (Wash Buffer NT3) und anschließende Zentrifugation (ebenfalls 90 Sekunden bei Raumtemperatur mit 11.000 g) von etwaigen Salzurückständen gereinigt. Eine erneute Zentrifugation über 2,5 Minuten entfernte zurückgebliebenen Waschpuffer aus der Säule. Bei geöffnetem Deckel wurden

die Säulen nun für 2 Minuten bei 70 °C im Thermoblock getrocknet. Anschließend wurden 20 µl vorgewärmter Elutionspuffer (Elution Buffer NE) hinzugegeben und durch die Säule zentrifugiert (1,5 Minuten, 11.000 g). Dieser löste die DNA wieder von der Silica-Säule, sodass sie sich nun im Durchfluss sammelte. Zur Erhöhung der Ausbeute an DNA wurde das Eluat abschließend nochmals auf die Säule aufpipettiert und durchlief mittels erneuter Zentrifugation das Säulenmaterial ein zweites Mal. Die Aufreinigungssäule konnte daraufhin verworfen werden; die Konzentration der nun im Eluat befindlichen DNA wurde photometrisch bestimmt.

2.4.5. Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Das Prinzip der photometrischen Konzentrationsbestimmung beruht auf der Messung der Intensitätsabschwächung eines Lichtstrahles definierter Wellenlänge beim Durchtritt durch eine Lösung. Diese Abschwächung (Extinktion) ist umso größer, je höher die Konzentration der gelösten Teilchen ist.

Zur photometrischen Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde ein Photometer (Bio-Photometer) der Firma Eppendorf verwendet. Zunächst wurde eine 1:10-Verdünnung der durch die Aufreinigung gewonnenen DNA durchgeführt (1 µl Probe + 9 µl ddH₂O). Nach Kalibrierung des Photometers mit doppelt destilliertem Wasser (Leerwert) wurden jeweils 8 µl der verdünnten Lösung in eine Quarzküvette eingefüllt und diese in die vorgesehene Messkammer eingesetzt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA. Zur Bestimmung der Reinheit der Probe wurde auch ihre Proteinkonzentration (bei 280 nm) bestimmt, die möglichst niedrig sein sollte. Der Quotient aus den Messwerten bei 260 und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) sollte daher über 1,8 liegen. Um genügend Material für die anschließende Sequenzierung zu garantieren, sollte der erzielte DNA-Gehalt mindestens 10 µg/ml betragen.

2.4.6. Sequenzierung der DNA [60]

Die Sequenzierung (also die Bestimmung der Basenfolge des DNA-Abschnitts) der Proben erfolgte gemäß dem von Sanger et al. [83] entwickelten Dideoxy-Verfahren

(Kettenabbruch-Methode). Diese Technik beruht auf dem parallelen Ansatz von vier Reaktionsgemischen, welche die jeweils zu sequenzierende DNA, eine DNA-Polymerase, spezifische Primer und die vier auch natürlich vorkommenden Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) enthalten. Außerdem wird jedem Ansatz je ein Didesoxy-Nukleosidtriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) zugesetzt. Diese ddNTP haben gegenüber den üblichen dNTP die Besonderheit, dass ihnen die Hydroxygruppe am C3-Atom fehlt, welche für das Anknüpfen des jeweils nächsten Nukleotids während der DNA-Synthese erforderlich ist. Deshalb kommt es beim Einbau eines solchen ddNTP an dieser Stelle zu einem Abbruch der DNA-Synthese (Termination).

Zum Start der Synthese durch die DNA-Polymerase benötigt diese den Primer. Danach schreitet die Kettenverlängerung (wie bei der natürlichen Replikation bzw. auch bei der PCR) Nukleotid für Nukleotid voran. Allerdings sind hierbei nun zwei Reaktionstypen in jedem Ansatz möglich: Entweder wird ein Desoxy-Nukleosidtriphosphat in die sich verlängernde DNA-Kette eingebaut (und die Biosynthese setzt sich fort) oder aber es wird ein ddNTP eingebaut (und es kommt an dieser Stelle zum Abbruch der Synthese). Da der Einbau eines ddNTP an Stelle eines dNTP dabei ein zufälliges Ereignis darstellt, gibt es somit in jedem Reaktionsansatz viele verschiedene, statistisch gleichmäßig verteilte Positionen, an denen es zum Kettenabbruch kommen kann. Beispielsweise kann es in dem Ansatz, welcher die ddATP enthält, überall dort zum Abbruch kommen, wo ein Nukleotid mit der Base Adenosin eingebaut werden muss. Dadurch entstehen im Laufe der Gesamtreaktion viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente pro Reaktionsgemisch. Trennt man die Syntheseprodukte der einzelnen Ansätze danach elektrophoretisch (also ihrer Größe entsprechend) nebeneinander auf, lässt sich die Abfolge der Basen des untersuchten DNA-Abschnitts ermitteln.

Aktuelle Verfahren verwenden an Stelle von vier unterschiedlichen Ansätzen nur einen Ansatz, der alle vier Didesoxynukleotide enthält. Diese sind nun jedoch zu ihrer Unterscheidbarkeit an vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, sodass die Analyse der Basensequenz in einem einzigen Arbeitsvorgang erfolgen kann.

(Die Sequenzierung der DNA-Proben der in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten wurde von einem externen Labor (Seqlab – Sequence Laboratory Göttingen GmbH, Göttingen) durchgeführt.)

Durch Vergleich der Basenfolge beim jeweiligen Patienten mit der physiologischen Sequenz des *RD3*-Gens bei gesunden Personen (*RD3 Retinal Degeneration 3* [Homo sapiens], Gene ID 343035 des National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/343035)), können dann etwaige Sequenzänderungen identifiziert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Mutationen im *RD3*-Gen sind eine mögliche Ursache der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA), einer Gruppe von hereditären frühkindlichen Netzhautdystrophien. Wie die Phänotypisierung der bisher identifizierten Patienten [30,79] zeigte, handelt es sich bei dem durch *RD3*-Mutationen bedingten LCA-Typ 12 um eine besonders schwere Verlaufsform.

Wie bereits in Abschnitt 1.4. (Zielsetzung der Arbeit) dargestellt, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie Patienten mit frühkindlichen Netzhautdystrophien auf Mutationen im *RD3*-Gen untersucht, um eine Aussage zur Häufigkeit von *RD3*-Mutationen als Erkrankungsursache bei diesen Patienten zu generieren. Die insgesamt 88 in die Untersuchung einbezogenen Patienten wurden zuvor gezielt aus einem Kollektiv von Fällen unterschiedlicher hereditärer Netzhautdegenerationen ausgewählt. Dabei waren zwei verschiedene Aspekte als Einschlusskriterien in das Screening ausschlaggebend: zum einen die Ähnlichkeit des Phänotyps mit dem der bereits identifizierten *RD3*-Patienten (Patientengruppe 1, Erläuterung s. Abschnitt 3.1.1.) und zum anderen das Vorliegen von Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (Patientengruppe 2, Erläuterung s. Abschnitt 3.1.2.).

Die Verteilung der 88 Patienten hinsichtlich Patientengruppe, Geschlecht, Diagnose und Herkunft kann den nachstehenden Tabellen 3-1 bis 3-4 und Abbildungen 4 bis 7 entnommen werden. Diese zusammenfassende Darstellung wird den detaillierten Erläuterungen zu den einzelnen Patientengruppen hier aus Gründen der Übersichtlichkeit vorangestellt.

Patientengruppe	Anzahl der untersuchten Personen
Patientengruppe 1	65
Patientengruppe 1a	22
Patientengruppe 1b	10
Patientengruppe 1c	33
Patientengruppe 2	23
Summe	88

Tabelle 3-1: Zusammensetzung des Gesamtkollektivs nach Patientengruppen

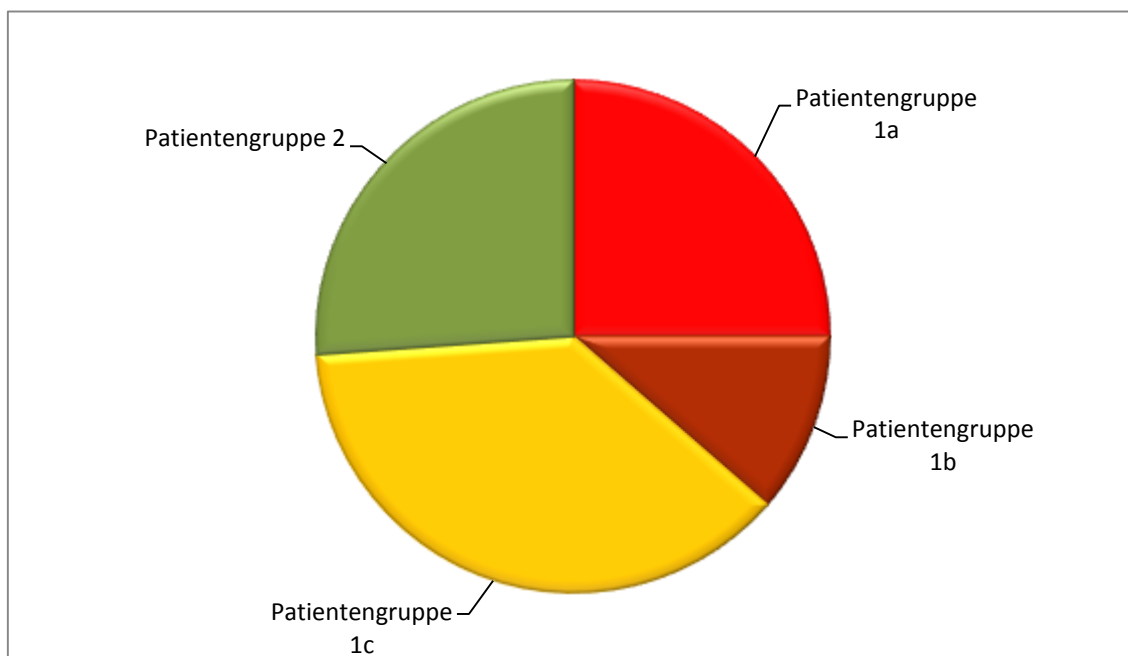


Abbildung 4: Zusammensetzung des Gesamtkollektivs nach Patientengruppen

Geschlecht	Anzahl der untersuchten Personen
männlich	47
weiblich	40
unbekannt	1
Summe	88

Tabelle 3-2: Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach dem Geschlecht

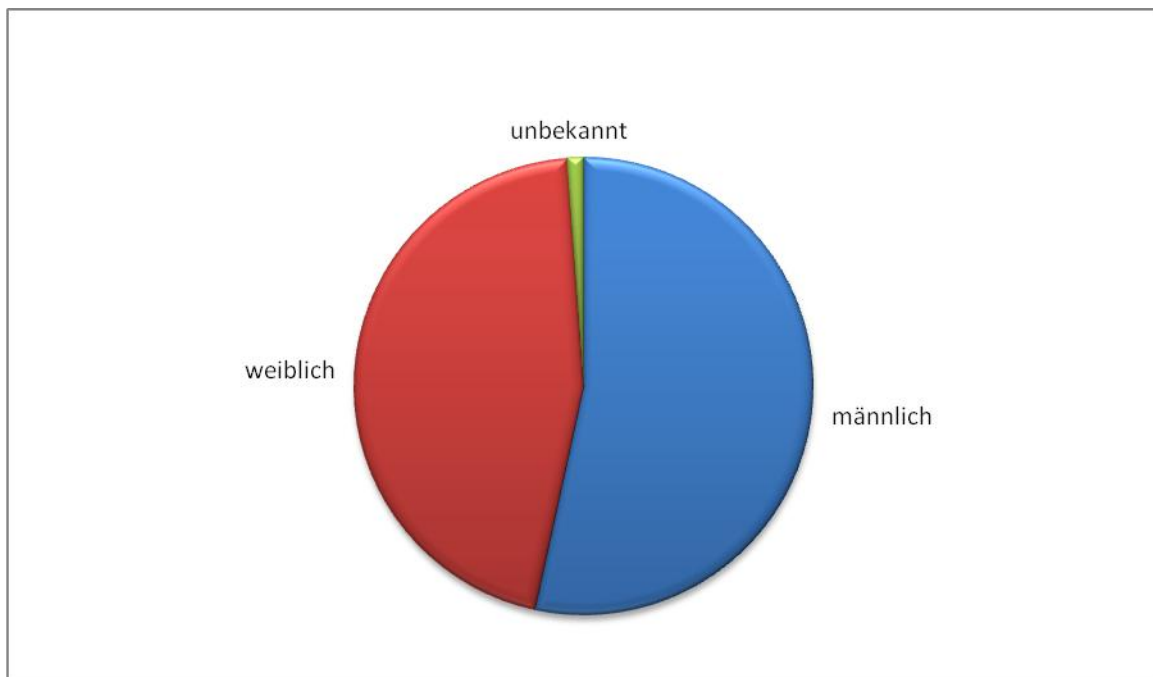
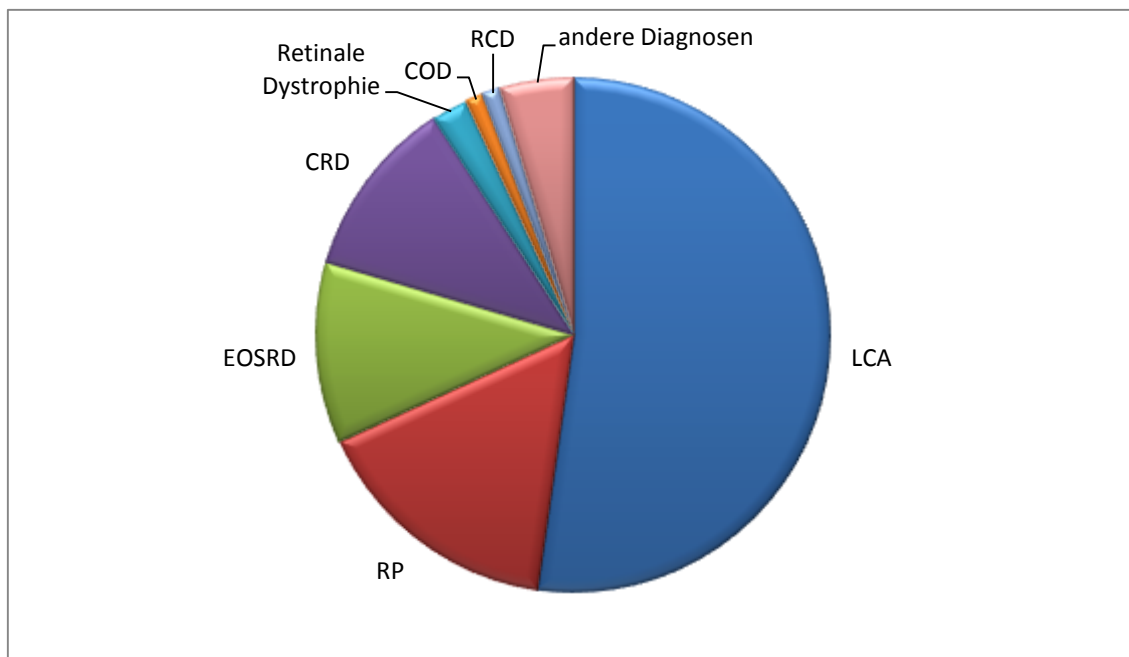


Abbildung 5: Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach dem Geschlecht

Diagnose	Anzahl der untersuchten Personen
LCA	46 (davon 17 Fälle mit gesicherter LCA Typ 1)
RP	14
EOSRD	10
CRD	10
Retinale Dystrophie	2
COD	1
RCD	1
anderweitig verschlüsselte Diagnosen	4
Summe	88

Tabelle 3-3: Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach den jeweiligen Diagnosen, unter denen die Patienten in der Datenbank erfasst waren



COD = Cone dystrophy, CRD = Cone-rod dystrophy, EOSRD = Early onset severe retinal dystrophy, LCA = Lebersche kongenitale Amaurose, RCD = Rod-cone dystrophy, RP = Retinopathia pigmentosa

Abbildung 6: Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach den jeweiligen Diagnosen, unter denen die Patienten in der Datenbank erfasst waren

Herkunft	Anzahl der untersuchten Personen
Mitteleuropa (deutschsprachiger Raum) ¹	51
Türkei	17
Ost- und Südosteuropa ²	6
Nordeuropa ³	5
Südeuropa ⁴	3
Nordafrika	3
andere Herkunft	3
Summe	88

¹ Patienten aus Deutschland, Österreich und der Schweiz

² Patienten aus Tschechien, Polen, Ungarn und den Nachfolgestaaten des ehemaligen Jugoslawiens

³ Patienten aus den skandinavischen Ländern

⁴ Patienten aus Italien

Tabelle 3-4: Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach der Herkunft der Patienten

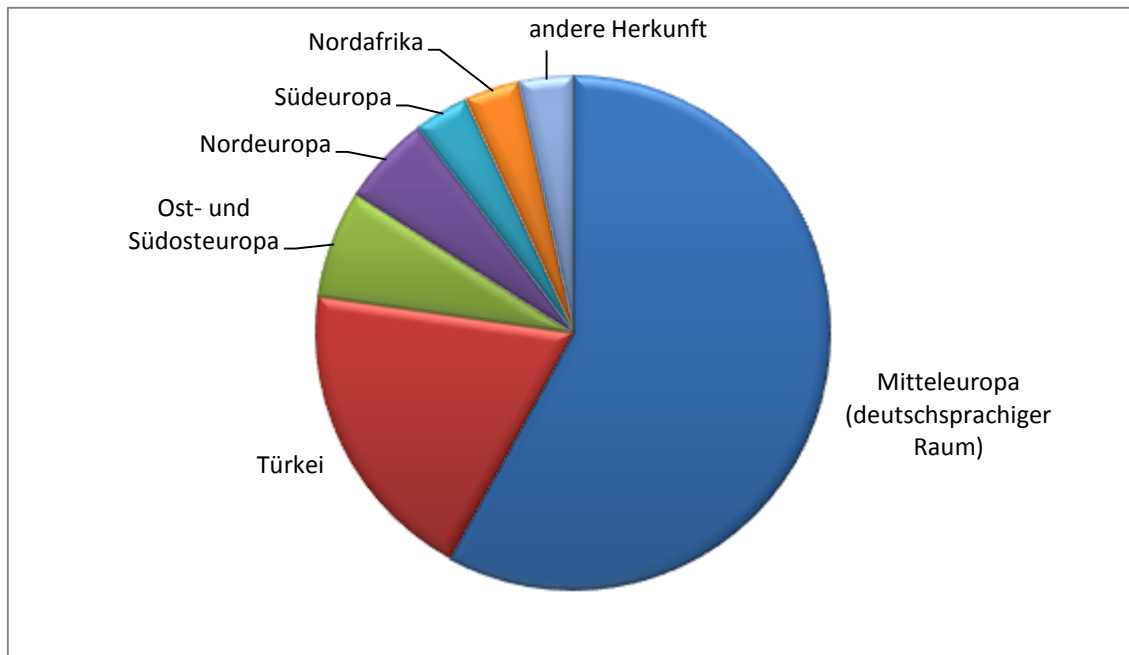


Abbildung 7: Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach der Herkunft der Patienten

3.1.1. Auswahl der Patienten nach phänotypischen Kriterien (Patientengruppe 1)

3.1.1.1. Patientengruppe 1a

Kriterien zur Auswahl von Patientengruppe 1a

Bei den verschiedenen Typen der Leberschen kongenitalen Amaurose besteht (wie auch bei anderen Erbkrankheiten) eine Beziehung zwischen der jeweils ursächlichen Mutation und dem daraus resultierenden spezifischen Krankheitsbild (Genotyp-Phänotyp-Korrelation). Das bedeutet, dass bei LCA-Patienten Mutationen in einem bestimmten Gen häufig mit einem für sie charakteristischen klinischen Bild der Betroffenen (also unterschiedlichen LCA-Typen) einhergehen. Eine Übersicht einiger durch Mutationen in bereits bekannten LCA-Genen verursachter Phänotypen ist in Tabelle 1-2 dargestellt. In der Annahme, dass eine solche Genotyp-Phänotyp-Korrelation auch bei Patienten mit *RD3*-Mutationen besteht, wurden deshalb gezielt solche Patienten für das Mutationsscreening ausgewählt, die in ihren klinisch-diagnostischen Befunden denen der bereits beschriebenen *RD3*-Patienten [30,79] möglichst ähnelten. Daher orientierten sich die Auswahlkriterien für das Untersuchungskollektiv an der phänotypischen Charakterisierung von *RD3*-Fällen, wie sie aus der Arbeit von Preising et al. [79] hervorgeht. Bei den dort beschriebenen Patienten handelt es sich um eine kurdischstämmige Familie, in der bei sechs Mitgliedern eine LCA diagnostiziert wurde. Als Ursache dieser LCA konnte dabei in allen sechs Fällen die homozygote Stopp-Mutation c.180C>A (p.Y60X) im *RD3*-Gen identifiziert werden. Die Analyse des Stammbaumes der Familie legte einen autosomal-rezessiven Erbgang als Vererbungsmodus dieses Gendefekts nahe. Eine detaillierte phänotypische Beschreibung ist in Abschnitt 1.3.4. dargestellt. Aus diesen Daten geht zusammenfassend hervor, dass es sich bei der durch *RD3*-Mutationen bedingten Netzhautdystrophie (der LCA Typ 12) um eine besonders schwere Verlaufsform der LCA handelt. Da nun (wie oben ausgeführt) in der Annahme einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei LCA Typ 12 gezielt solche Patienten auf Mutationen im *RD3*-Gen untersucht werden sollten, die den bereits beschriebenen *RD3*-Patienten in ihren klinisch-diagnostischen Befunden ähnelten, wurden zunächst folgende Auswahlkriterien aufgestellt:

- deutlich herabgesetzter Visus ($\leq 0,1$) in den ersten beiden Lebensjahren
- unter die Nachweisgrenze herabgesunkene Antworten im ERG in den ersten beiden Lebensjahren (wenn entsprechende Informationen hierzu verfügbar waren).

Konkret wurde bei der Auswahl dieser Patienten folgendermaßen vorgegangen:

Grundlage der Recherchen war die Patientendatenbank des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen. Aus dieser Datenbank wurden zunächst solche Patienten herausgesucht, bei denen eine hereditäre Netzhautdystrophie vorlag, deren genetische Ursache zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärt war. Für die meisten Patienten waren zuvor Mutationen in verschiedenen anderen in Frage kommenden Genen ausgeschlossen worden. In das Untersuchungskollektiv einbezogen wurden dabei v. a. Netzhautdystrophie-Patienten, die unter einer der folgenden Diagnosen in der Datenbank erfasst waren:

- LCA = Lebersche kongenitale Amaurose,
- EOSRD = Early onset severe retinal dystrophy
= schwere frühkindliche Netzhautdystrophie,
- RP = Retinitis pigmentosa,
- CRD = Cone-rod dystrophy = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie,
- RCD = Rod-cone dystrophy = Stäbchen-Zapfen-Dystrophie,
- COD = Cone dystrophy = Zapfendystrophie,
- Retinale Dystrophie.

Bei dieser Auswahl wurden nur solche Patienten berücksichtigt, die im Jahr 1970 oder später geboren wurden. Diese Eingrenzung des Untersuchungskollektivs war (neben der Begrenzung der Probandenzahl) aus folgendem Grund sinnvoll: Je weiter die Geburt der jeweiligen Patienten zurücklag, desto spärlicher waren die Informationen, die über die frühe Krankheitsentwicklung in den ersten Lebensjahren vorlagen. Dies liegt zum einen daran, dass Befunde, die weit in der Vergangenheit erhoben wurden, seinerzeit zumindest teilweise nicht nach heutigen Standards erfasst und dokumentiert werden konnten (EDV) bzw. über die Jahre hinweg auch verloren gingen. Zum anderen standen früher viele Methoden wie z. B. das OCT noch gar nicht zur Verfügung, sodass entsprechende Befunde aus der frühen Kindheitsentwicklung bei Patienten ab einem bestimmten Alter heute gar nicht vorliegen können.

Das daraufhin zusammengestellte Patientenkollektiv war demnach hinsichtlich dreier Kriterien eingegrenzt: erfasste Diagnose, unbekannte genetische Ursache, Geburtsjahrgang 1970 und später. Im nächsten Schritt wurden nun die Krankenblätter dieses eingegrenzten Kollektivs systematisch analysiert und die relevanten, zumeist über Jahre hinweg erhobenen klinischen Daten tabellarisch erfasst. Diese Zusammenstellung klinischer Daten bildete daraufhin die Grundlage, anhand derer die tatsächlich auf *RD3*-Mutationen zu testenden Patienten nach den oben genannten phänotypischen Kriterien ausgewählt wurden.

Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 1a)

Tabelle 3-5 zeigt die Befunde der auf die oben beschriebene Weise für das Screening ausgewählten 22 Fälle. Für jeden einzelnen Patienten sind darin angegeben:

- die DNA-Nummer,
- das Geburtsjahr,
- das Geschlecht (auch wenn dieses kein Auswahlkriterium war, da der *RD3*-bedingten LCA ein autosomal-rezessiver Erbgang zu Grunde liegt),
- die Diagnose, unter der die Patienten in der Datenbank erfasst waren,
- eine zusammenfassende Darstellung der klinisch-diagnostischen Daten zu dem jeweiligen Patienten.

Zu der Darstellung der Patientendaten sind folgende Punkte anzumerken:

1. Die gezeigten Daten wurden retrospektiv bei der Durchsicht der Krankenblätter erhoben. Dabei waren die klinischen Angaben teilweise von Patient zu Patient und von Untersuchungszeitpunkt zu Untersuchungszeitpunkt sehr uneinheitlich, was darauf zurückzuführen ist, dass die Daten oft über die Jahre hinweg von unterschiedlichen Augenkliniken und niedergelassenen Augenärzten sowie zum Teil auch von Kollegen aus anderen Fachgebieten (z. B. Kinderärzte) erhoben wurden. Entsprechend sind auch die aus diesen Informationen abgeleiteten, hier gemachten

tabellarischen Angaben zum Teil heterogen. Zum größten Teil wurden die Patienten, deren DNA untersucht wurde, mindestens einmal in der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg bzw. der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig Universität Gießen untersucht. Die DNA-Proben der Patienten, die nicht in Regensburg oder Gießen, sondern ausschließlich andernorts vorstellig waren, wurden dem Labor der Klinik von externen Untersuchern zugesandt.

2. Bei manchen der Patienten lagen nicht zu jedem interessierenden Abschnitt ihres Krankheitsverlaufs alle theoretisch wünschenswerten Untersuchungsbefunde vor. Dies kann zum einen daran liegen, dass der Befund zu diesem Zeitpunkt tatsächlich (noch) nicht erhoben worden war oder zum anderen daran, dass ein in der Vergangenheit (möglicherweise andernorts) erhobener Befund im Krankenblatt nicht vorlag. Soweit realisierbar, wurden die frühestmöglichen Angaben zu dem Patienten (z. B. für Visus und ERG), die aus den Krankenblättern zu ermitteln waren, angegeben. Wenn ausschließlich Befunde ab einem höheren Patientenalter als gewünscht vorlagen, konnten entsprechend nur Vermutungen (aufgrund der Aktenlage) über die Entwicklung (z. B. des Sehvermögens) in den ersten Monaten und Jahren angestellt werden. Auch solche Patienten bei denen also eine entsprechend deutlich herabgesetzter Visus oder ein unterhalb der Nachweisgrenze liegendes ERG in den ersten Lebensjahren aufgrund der vorliegenden Daten als sehr wahrscheinlich angenommen werden musste, wurden auf *RD3*-Mutationen untersucht.
3. Bei der Darstellung der einzelnen Befunde wurden die zum Teil sehr umfangreichen Angaben, die aus den Krankenblättern gewonnenen werden konnten, zur Verbesserung der Übersichtlichkeit auf die als relevant erachteten Informationen reduziert. Die in den Tabellen 3-5 und 3-6 wiedergegebenen Patientendaten sind daher in stark komprimierter Form dargestellt.
Angeführt werden (soweit im Aktenmaterial vorhanden) Befunde zu Visus, Elektroretinogramm, Lichtreaktion, Nystagmus, Strabismus, Photophobie, Refraktion, Fundus und Familienanamnese.

Die beiden für die Patientenauswahl entscheidenden Kriterien waren der Visus und die ERG-Befunde. Zum besseren Verständnis der Angaben, die zu diesen beiden Parametern in den Tabellen dargestellt sind, hier einige Anmerkungen:

- **Visus:** [32]

Der Visus beschreibt das maximale Auflösungsvermögen des Auges für kleine Objekte. Rechnerisch ergibt er sich aus dem Kehrwert des Winkels, unter dem das Auge zwei Objektpunkte gerade noch als getrennt wahrnehmen kann (Minimum separabile). Man unterscheidet dabei den Visus cum correctione (= Visus c.c. oder Sehschärfe), der als das Auflösungsvermögen des Auges bei bestmöglicher Korrektur etwaiger Refraktionsfehler definiert ist, vom Visus sine correctione (= Visus s.c. = Sehleistung), der das Auflösungsvermögen ohne optische Korrektur bezeichnet.

Die Methoden, nach denen der Visus erhoben werden kann, variieren je nach Altersstufe des Patienten, zum Teil aber auch nach den Vorlieben des jeweiligen Untersuchers. So können für Erwachsene z. B. Tafeln mit verschiedenen Sehzeichen (wie Zahlen, Landolt-Ringe oder E-Haken) in definierten Größenabstufungen verwendet werden. Der Visus ergibt sich dann als Quotient aus der Ist-Entfernung (tatsächlicher Messabstand) und der Soll-Entfernung (aus der ein Normalsichtiger das jeweilige Zeichen gerade noch erkennen kann) und kann Werte von $> 1,0$ bis $< 0,1$ annehmen. Für Kinder existieren entsprechende Sehzeichentafeln mit kindgerechten Symbolen (z. B. LEA-Zeichen). Bei noch kleineren Kindern kann beispielsweise der Preferential-looking-Test (mit Teller-Acuity-Cards oder Cardiff-Cards) angewandt werden. Das Prinzip dieses Testverfahrens beruht darauf, dass dem Kind eine Fläche dargeboten wird, deren eine Hälfte ungemustert ist und deren andere Hälfte ein Muster gleicher mittlerer Helligkeit wie der ungemusterte Teil aufweist. Reicht das Auflösungsvermögen des Patientenauges aus, um das gezeigte Muster aufzulösen, wird er diesem seine Aufmerksamkeit zuwenden und entsprechend dorthin schauen. Aus der Feinheit des Streifenmusters,

welches gerade noch erkannt wird, können dann Rückschlüsse auf den Visus gezogen werden.

Auch bei der Erhebung der Daten des vorliegenden Patientenkollektivs wurden von den verschiedenen Untersuchern unterschiedliche Techniken zur Visuserhebung verwandt. Falls nötig, wurden daher die jeweiligen Angaben (z. B. aus den verschiedenen Arztbriefen) zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Werte für die vorliegende Tabelle in eine möglichst einheitliche Darstellungsform gebracht.

Falls bei einem Patienten eine Visusbestimmung, die eine Angabe der Sehschärfe (oder Sehleistung) als Zahlenwert zulässt, nicht (mehr) möglich war, erfolgten die Angaben in den üblichen Abstufungen: „Fingerzählen“ (z. B. in 30 cm Abstand), das Erkennen von „Handbewegungen“, „Lichtscheinprojektion“ (also Angabe der Lichtrichtung) oder „Lichtscheinwahrnehmung“. Bei sehr kleinen Kindern findet sich auch öfters die Angabe „keine Fixationsaufnahme“ als Indiz für einen sehr stark reduzierten Visus.

Gelegentlich kann die Prüfung der direkten und indirekten Lichtreaktion Hinweise auf das Auflösungsvermögen des Auges liefern. Wenn diese physiologische Reaktion aufgrund einer schon weit fortgeschrittenen Netzhautdystrophie gestört oder gar erloschen ist, kann man daraus auf einen entsprechend ebenfalls deutlich herabgesetzten Visus schließen.

Ein weiterer Hinweis auf ein frühzeitig erloschenes Sehvermögen bei Säuglingen ist das okulodigitale Phänomen (Franceschetti-Zeichen). Es beschreibt die Erscheinung, dass erblindete Kinder oft mit den Fingern an ihren Augen manipulieren („Augenbohren“), um durch Druck als inadäquaten Reiz auf die Netzhaut Seheindrücke zu erzeugen.

Elektroretinogramm: [7,32,65]

Das Elektroretinogramm ist ein elektrophysiologisches Verfahren zur Untersuchung der Funktion retinaler Zellen, welches z. B. in der Diagnostik degenerativer Netzhauterkrankungen eingesetzt wird. Dem Patienten werden dazu kleine Elektroden am Auge fixiert, welche entweder in eine Kontaktlinse eingebracht sind oder als Fadenelektrode in den unteren Konjunktivalsack eingelegt werden. Als Referenzelektrode dient eine Hautelektrode, die z. B. an der Stirn befestigt werden kann. Bei Säuglingen ist es in der Regel erforderlich, diese Untersuchung in Narkose durchzuführen, um optimale Ableitbedingungen herzustellen.

Bei der Untersuchung wird die Netzhaut durch definierte Lichtsignale angeregt, wobei die daraus resultierenden Potentialänderungen der einzelnen Zellen abgeleitet werden können. Dies geschieht im dunkeladaptierten Zustand (skotopisches ERG) zur Messung der Stäbchenfunktion und im helladaptierten Zustand (photopisches ERG) zur Messung der Zapfenfunktion. Die resultierende Kurve, welche aufgezeichnet wird, zeigt im physiologischen Zustand zuerst eine sogenannte (negative) a-Welle, welche v. a. die Erregung der Photorezeptorzellen selbst (Hyperpolarisation) widerspiegelt. Die darauf folgende (positive) b-Welle ist hingegen ein Ausdruck der elektrischen Aktivität von Müller-Gliazellen und Bipolarzellen. Eine weitere (in der klinischen Routine oft nicht erfasste) Potentialschwankung stellt die c-Welle dar, welche u. a. durch elektrische Vorgänge im retinalen Pigmentepithel bedingt ist.

Typischerweise sinken die elektroretinographischen Antworten von LCA-Patienten bis unter die Nachweisgrenze ab, und das oft sogar schon vor dem Auftreten eindeutiger Veränderungen am Augenhintergrund. Je schwerer die Verlaufsform der LCA, desto früher können keine Potentiale mehr gemessen werden.

Tabelle 3-5: Patientengruppe 1a (22 Patienten):

DNA-Nr. Geschlecht Geburtsjahr Diagnose	Alter bei Unter- suchung in Jahren	Visus	ERG	Lichtreaktion	Nystagmus	Strabismus
<u>0088.03</u> w 1997 LCA	1	Fix Licht + Fol ↓↓	OU s/p Ø	OU ↓	intermittierend, opsoklonusartig	OS ⊖10°
<u>0667.01</u> m 2001 LCA	< 1	Fix Ø Fol Ø	kA	OU Ø	kA	kA
<u>0668.01</u> w 2000 LCA	1	Fol Licht + Fol Gegenstände Ø anamnestisch Fix Ø mit 7 Wo	OU s/p Ø	OU ↓↓	↔ P	alt ⊖10°
<u>0695.01</u> w 1998 LCA	3	OU 0,01	OU s/p Ø	kA	↑ P	OS ⊖15°
<u>0725.01</u> w 2001 LCA	< 1	Fix Ø	OU s/p ↓↓	kA	+	kA
<u>0728.01</u> w 1994 LCA	< 1	Fix Ø	OU s/p Ø	OU ↓↓	↔ R	kA
<u>0772.02</u> m 2001 LCA	1	Fix Ø Fol Ø	OU s/p Ø	OU ↓↓	↔ P/R	OD ⊖
<u>0779.01</u> w 1984 LCA	2	kA	OU s/p Ø	kA	kA	kA

Photophobie	Refraktion	Fundus	Familien-anamnese	DNA-Nr. Geschlecht Geburtsjahr Diagnose
kA	OU +6,0/-1,0/180°	OU verengte Gefäße	kA	<u>0088.03</u> w 1997 LCA
kA	kA	OU Papille blass, hypoplastisch; Makula nicht eindeutig abgrenzbar; feinkörnige Pigmentierungen in mittlerer und äußerer Peripherie; zirkulär Aderhautgefäße sichtbar	kA	<u>0667.01</u> m 2001 LCA
kA	OD +10,0/-2,0/0° OS +10,0/-1,0/0°	OU leichtgradig fein granulierte Struktur der Netzhaut	kA	<u>0668.01</u> w 2000 LCA
kA	OD +7,0/-1,0/10° OS +8,5/-1,5/170°	OU in gesamter Peripherie weißliche Veränderungen außerhalb der Gefäßbögen	kA	<u>0695.01</u> w 1998 LCA
kA	kA	kA	kA	<u>0725.01</u> w 2001 LCA
kA	OU +5,0 sph.	oB	Konsang. (Eltern sind Verwandte 4. Grades)	<u>0728.01</u> w 1994 LCA
++	OD +9,0/-0,5/90° OS +9,0/-0,5/110°	OU in Makula und Peripherie feine Granulationen; angedeutet metallische Reflexe peripher	kA	<u>0772.02</u> m 2001 LCA
kA	kA	OU Papille blass; Makula mit zarten PV; in mittlerer Peripherie helle, spindelförmige Flecken; in mittlerer bis äußerer Peripherie feine Pigmentationen und rarifiziertes PE	kA	<u>0779.01</u> w 1984 LCA

	12	LSP + anamnestisch seit Geburt schlechter Visus	OU s/p ↕↕	OU ↕↕	kA	⊖
	18	LW + HBW ↕	kA	OU ↕↕	↔ R	OD ⊖15° ⊖VD5°
<u>0785.03</u> w 2001 LCA	< 1	Fix fraglich	OD kA OS s/p ∅	OU ∅	↕ R	kA
	1	Fol Licht +	kA	kA	kA	kA
	2	OU LSP + okulodig. Phänomen	kA	kA	kA	kA
	3 und 4	OU LSP +	kA	kA	kA	kA
	5	OU LSP +	kA	kA	kA	kA
<u>0903.01</u> m 1995 EOSRD	4	cc OU 0,08	kA	kA	+	kA
	7	Fernvisus sc OD 0,03 sc OS 0,04 (LEA)	OU s/p ∅	kA	kA	kA
<u>1050.01</u> w 1988 LCA	1	Fix ∅ Fol ∅	OU s/p ↕↕	OU ↕↕	↔	kA
	3	kA	OU s/p ↕↕	kA	kA	kA
	15	HBW +	kA	OU ↕	↔ R	kA
<u>1119.01</u> m 1999 LCA	< 1	OU Fix ∅	kA	OU ∅	↕	kA
	1	kA	kA	kA	kA	⊖
	2	OU Fix ∅	kA	kA	kA	kA
	4	OU Fix ∅ OKN ∅	OU s/p ∅	OU ∅	kA	kA

kA	kA	OD kein Einblick OS Papille mit leichter Randunschärfe; Makula mit Pigmentauflockerungen und Hyperpigmentierungen; in Peripherie durchgreifende PE-Atrophie	Schwester ebenfalls betroffen; Tante mit V.a. LCA	
kA	kA	kA	kA	
+	OU +8,0 sph.	OU periphere Pigmentansammlung bei sonst pigmentarmer Netzhaut	kA	<u>0785.03</u> w 2001 LCA
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	OU Papille blass; kein MWR; PE- Verschiebungen; Gefäße enggestellt	kA	
kA	OD +9,0/-0,5/90° OS +10,0/-0,5/90°	OU Papille hyperopisch prominent; Makula verstrichen; PV in Makula und Peripherie	kA	<u>0903.01</u> m 1995 EOSRD
kA	kA	kA	kA	
kA	OU +8,0 sph.	oB	kA	<u>1050.01</u> w 1988 LCA
kA	kA	kA	kA	
kA	OD +4,0/-2,0/0° OS +4,0/-2,5/0°	OU Papille blass; Makula ohne MWR; Gefäße eng; Peripherie mit vereinzelten Pigmentverklumpungen	kA	
kA	OD +3,5/+1,0/90° OS +6,0 sph.	OU Papille leicht abgeblasst; Gefäße eng; im Zentrum feinkörnige Pigmentierungen	kA	<u>1119.01</u> m 1999 LCA
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	OD +4,5/-0,5/100° OS +4,5/-0,5/80°	OU zentraler Bereich von Atrophiezonen mit irregulären Hyperpigmentierungen; ab mittlerer Peripherie Pfeffer-Salz-Fundus; enggestellte Gefäße	Konsang. (Eltern sind Verwandte 4. Grades)	

<u>1135.01</u> m 2002 LCA	1	bin 0,32 cy/cm (TAC) \triangle Visus < 0,01	OU s/p $\Downarrow\Downarrow$	OU \Downarrow	P	$\oplus 8^\circ$
<u>1145.01</u> w 1971 LCA	27	kA	OU s/p \emptyset	kA	kA	kA
	33	OU LW anamnestisch seit Kindheit nur LW Diagnosestellung LCA mit 6 Mo	kA	OU $\Downarrow\Downarrow$	kA	kA
<u>1369.01</u> m 2003 LCA	1	Fix Licht \emptyset Abwehr bei Okklusion \emptyset	OU s/p \emptyset	OU $\Downarrow\Downarrow$	P	kA
<u>1405.01</u> m 1998 LCA	6	OU LW + anamnestisch Seh- probleme bereits mit 1,5 Mo auffällig okulodig. Phänomen	kA	kA	kA	kA
	7	cc OD 0,025 cc OS 0,03 (LEA)	OU s/p \emptyset	OU \Downarrow	P	OS $\ominus 5^\circ$ \ominus VD5° OD deorso- adductorius
	8	cc OD 0,013 cc OS 0,017 (LEA)	kA	kA	kA	kA
	9	cc OD 0,007 cc OS 0,008 (LEA)	kA	kA	kA	kA
<u>1567.01</u> w 2004 LCA	1	Fix \emptyset	OU s/p \emptyset	OU \Downarrow	P mit rotatorischer Komponente	alt \ominus
<u>1630.03</u> m 2005 LCA	1	Fix \emptyset	kA	OU \Downarrow	P	alt \ominus
	2	Fix \emptyset Fol \emptyset Abwehr bei Okklusion +	kA	kA	kA	kA

++	OU +6,0 sph.	oB	kA	<u>1135.01</u> m 2002 LCA
kA	kA	kA	kA	<u>1145.01</u> w 1971 LCA
kA	kA	OU Makula ohne MWR; Peripherie pigmentarm, feinfleckig	kA	
kA	kA	OU Makula nicht differenziert; Gefäße eng; in Peripherie diskrete Pigmentdissoziationen; Fundus insgesamt sehr hell	kA	<u>1369.01</u> m 2003 LCA
kA	kA	kA	kA	<u>1405.01</u> m 1998 LCA
kA	OD +4,5/-2,0/37° OS +4,5/-3,0/148°	OU Makula mit Pigmentverklumpungen; Gefäße eng; in Peripherie Pfeffer-Salz-Aspekt	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	OD +5,0/-1,0/0° OS +2,0/-1,0/0°	OU MWR fehlt; ausgeprägte Entstellung der Gefäße; ab mittlerer Peripherie ausgeprägt körnige Fundusstruktur mit unregelmäßigen Hypo- und Hyperpigmentierungen; peripapilläre Pigmentverklumpungen	kA	<u>1567.01</u> w 2004 LCA
kA	OD +8,5/-2,5/5° OS +9,0/-2,5/65°	OU fehlender Zentralreflex	kA	<u>1630.03</u> m 2005 LCA
kA	kA	kA	kA	

<u>1674.01</u> m 2002 EOSRD	4	cc OD 0,11 cc OS 0,05 (LEA)	OU s/p Ø	kA	P intermittierendes Headnodding	kA
<u>1774.01</u> w 1982 LCA	< 1	Fix Licht Ø	kA	kA	kA	kA
	1	Fix Ø Suchbewegungen	OU s/p Ø	OU Ø	P	kA
	12	kA	OU s/p Ø	kA	kA	kA
	24	OU HBW	kA	OU ⇓⇓ enge Pupillen	P	kA
<u>1825.01</u> m 2005 LCA	2	bin 0,02	kA	kA	+	kA
<u>1852.01</u> w 2004 LCA	2	cc OU 0,08 cc bin 0,15	kA	kA	⇕ bei Fixations- aufnahme	kA
	3	cc OU 0,1 anamnestisch Sehprobleme bereits mit 6 Mo auffällig: Augenzittern, Greif- unsicherheit)	OU s/p Ø	oB	R Zunahme im Aufblick	kA

++ stark ausgeprägt, + vorhanden, ⇓ reduziert, ⇓⇓ stark reduziert, Ø nicht vorhanden, / keine Angabe

⊕ Strabismus convergens, ⊖ Strabismus divergens

↔ horizontaler Nystagmus, ⇑ vertikaler Nystagmus

alt = alternierend, bin = binokular, cc = cum correctione, cy/cm = cycles/cm, Fix = Fixation, Fol = Folgebewegungen, HBW = Handbewegungen, Konsang. = Konsanguinität, LEA = LEA-Symbole, LSP = Lichtscheinprojektion, LW = Lichtwahrnehmung, m = männlich, Mo = Monate, MWR = Makulawallreflex, OD = Oculus dexter, OKN = optokinetischer Nystagmus, oB = ohne Befund, OS = Oculus sinister, OU = Oculi utrique, okulodig. Phänomen = okulodigitales Phänomen, p = photopisch, P = Pendelnystagmus, PE = Pigmentepithel, PV = Pigmentverschiebungen, R = Rucknystagmus, s = skotopisch, sc = sine correctione, TAC = Teller-Acuity-Cards, VD = Vertikaldeviation, w = weiblich, Wo = Wochen

Tabelle 3-5: Patientengruppe 1a (22 Patienten)

++	OD +4,5/-2,5/15° OS +6,5/-3,0/10°	OU Papille geringgradig prominent und randunscharf; MWR fehlt; am gesamten Fundus Pigmentunregelmäßigkeiten und Pigmentverklumpungen	Konsang. (Eltern sind Verwandte 2. Grades)	<u>1674.01</u> m 2002 EOSRD
kA	kA	kA	kA	<u>1774.01</u> w 1982 LCA
kA	kA	OU Gefäße etwas enggestellt	kA	
kA	kA	kA	kA	
+	OU +5,0 sph.	OU peripher vereinzelte Knochenkörperchen	kA	
kA	kA		Schwester ebenfalls betroffen	<u>1825.01</u> m 2005 LCA
kA	OD +8,25/-3,5/0° OS +8,75/-3,0/0°	OU Papille Temporal blass; PV am hinteren Pol	kA	<u>1852.01</u> w 2004 LCA
kA	kA	OU Papille leicht blass; Gefäße enggestellt; peripapilläre Pigmentproliferationen; PE-Verklumpungen	kA	

3.1.1.2. Patientengruppe 1b

Kriterien zur Auswahl von Patientengruppe 1b

Außer den in Tabelle 3-5 aufgeführten 22 Fällen wurden noch weitere 10 DNA-Proben von Patienten auf *RD3*-Mutationen getestet, deren klinische Befunde nicht exakt den beiden oben definierten Kriterien zu Visus und ERG entsprachen. Es handelte sich dabei ebenfalls um Patienten mit schweren hereditären Netzhautdystrophien, deren genetische Ursache noch nicht geklärt werden konnte. Diese 10 Fälle wichen nur geringfügig von den für Patientengruppe 1a geltenden strengen Kriterien ab, z. B. hinsichtlich folgender Aspekte:

- Visus in den ersten Lebensjahren ebenfalls bereits deutlich reduziert (auf $\leq 0,3$), jedoch noch besser als 0,1
- im ERG noch ableitbare Restantworten
- Zeitpunkt der (vorliegenden) Erstuntersuchung zu spät, um fundierte Aussagen über die sehr frühe Kindheitsentwicklung machen zu können.

Diese Patienten sind als Patientengruppe 1b in Tabelle 3-6 aufgeführt.

Die hierbei ausgewählten Fälle stammten aus derselben Patientendatenbank, aus der auch Patientengruppe 1a rekrutiert wurde und waren dort unter den gleichen Diagnosen verschlüsselt wie diese. Auch bei diesem Kollektiv wurden nur Patienten, die im Jahr 1970 oder später geboren wurden, berücksichtigt.

Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 1b)

Die aus den Krankenblättern gewonnenen Angaben wurden – wie bereits in Tabelle 3-5 – auf die als relevant erachteten Informationen beschränkt und somit stark reduziert dargestellt. Zusätzlich findet sich in der Zeile unterhalb jedes Patienten jeweils eine kurze Erläuterung, warum dieser in das Untersuchungskollektiv aufgenommen wurde.

Tabelle 3-6: Patientengruppe 1b (10 Patienten):

DNA-Nr. Geschlecht Geburtsjahr Diagnose	Alter bei Unter- suchung in Jahren	Visus	ERG	Lichtreaktion	Nystagmus	Strabismus
<u>0122.01</u> w 1989 EOSRD	4	sc OD 0,3 / OS 0,2	kA	kA	kA	kA
	5	Fernvisus sc OD 0,1 / OS 0,1 Fernvisus cc OD 0,2 / OS 0,1	kA	kA	kA	kA
	6	Fernvisus cc OD 0,2 / OS 0,125 Nahvisus cc bin 0,24	kA	kA	kA	kA
	7	Fernvisus sc OD 0,1 / OS 0,08 Fernvisus cc OD 0,3 / OS 0,1	OU s/p Ø	kA	kA	kA
	9	Fernvisus sc OD 0,2 / OS 0,1 Fernvisus cc OD 0,3 / OS 0,1	kA	kA	kA	kA
	11	Fernvisus sc OD 0,1 / OS 0,04 Nahvisus sc OD 0,1 / OS 0,1	kA	kA	kA	kA
	13	Fernvisus sc OD 0,1 / OS 0,1 Nahvisus sc OD 0,1 / OS 0,1	OU s/p Ø	kA	kA	kA
<u>0255.01</u> m 1982 CRD	8	Fernvisus cc OD 0,05 / OS 0,1 Nahvisus cc bin < 0,1	kA	kA	kA	kA
	10	Fernvisus sc OD 0,05 / OS 0,05 Fernvisus cc OD 0,1 / OS 0,1	kA	kA	kA	kA
	11	Fernvisus cc OD 0,05 / OS 0,05	OU s/p ↴	kA	kA	alternierend ⊖
	13	Fernvisus cc OD 0,08 / OS 0,08	kA	kA	kA	kA
	15	Fernvisus sc OD 0,05 / OS 0,05	kA	kA	kA	kA
	17	Fernvisus sc OD 0,1 / OS 0,05	kA	kA	kA	kA
	21	kA	OU s/p ↴↴	kA	kA	kA
	23	Fernvisus sc OD 0,03 / OS HBW+	kA	kA	kA	kA

Photophobie	Refraktion	Fundus	Familien-anamnese	DNA-Nr. Geschlecht Geburtsjahr Diagnose
kA	kA	kA	kA	<u>0122.01</u> w 1989 EOSRD
++	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	OU Papille gelblich mit peripapillärer Hypopigmentierung; MWR fehlt; dünne Gefäße; in Peripherie multiple kleine gelbliche Areale auf hypopigmentiertem Grund und beginnende Pigmentverklumpungen	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	OU Papille blass; Gefäße eng; PE-Defekte in Makula und Peripherie; einzelne Knochenkörperchen in Peripherie	kA	
kA	OD +3,5/-1,0/0° OS +3,5/-0,5/0°	OU zentral ausgeprägte Pigmentverklumpungen und hypopigmentierte Areale; peripher ebenfalls PV	kA	<u>0255.01</u> m 1982 CRD
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	kA	kA	
kA	kA	OU Papille stark abgeblasst; in mittlerer Peripherie Knochenkörperchen; Gefäße eng; RPE hochgradig atrophisch	kA	

0602.01 m 1977 RP	22	Fernvisus cc OD 0,01 / OS 0,05 Nahvisus cc OD 0,08 / OS 0,06	OU s/p Ø	kA	kA	kA
	24	Fernvisus sc OU Fingerzählen (in 30 cm) anamnestisch erste Sehprobleme im Alter von 7 Jahren	kA	kA	kA	kA
0976.01 w 1984 RP	22	Fernvisus sc OD 0,1 / OS 0,1 Nahvisus sc OD 0,2 / OS 0,2	OU s/p Ø	kA	kA	kA
1046.01 w 1986 RP	18	Fernvisus cc OD 0,1 / OS 0,05 Nahvisus cc OD 0,1 / OS 0,1	OU s/p Ø	oB	kA	kA
1212.01 m 1997 LCA	2	anamnestisch in den ersten 6 Mo normale Fixation; Sehprobleme mit 1 Jahr aufgefallen	OU s/p Ø	kA	kA	kA
	7	cc OD 0,3 / OS 0,04	kA	oB	kA	OS ⊕
1295.01 m 2003 RP	1	Fixation Licht Ø Preferential-looking-Test Ø	OU s/p ↓	OU ↓	kA	schwan- kender Winkel
1399.01 m 2002 Ret. Dyst.	3	sc OD 0,2 / OS 0,2 (Cardiff-Cards in 1m)	OU s/p ↓↓	kA	↔ P/R	⊕ leicht
1423.01 w 2001 LCA	4	OD 0,02 / OS 0,04 (LEA) anamnestisch bereits mit 1,5 Mo ausgeprägte Sehminderung festgestellt	OU s/p ↓↓	kA	↔ R	schwan- kender Winkel
1603.01 w 1999 Ret. Dyst.	6	Fernvisus cc OD 0,1 / OS 0,05 Nahvisus cc OD 0,063/OS 0,063 anamnestisch seit Kleinkindes- alter Bewegungen vorsichtig und unsicher	OU s/p ↓↓	kA	↔ R	⊖5°
	7	Nahvisus cc OD 0,1 / OS 0,1 / bin 0,16 (LEA)	OU s/p ↓↓	OU ↓	↔ R	oB

kA	kA	OU Papille mit pigmentiertem Saum; Gefäße eng; Knochenkörperchen	kA	<u>0602.01</u> m 1977 RP
kA	kA	OU Papille wachsgelb, 0,4-0,5 exkaviert; MWR stumpf; zentral feinkörnige Pigment- verklumpung und PE-Defekte; in mittlerer Peripherie Knochenbälkchen mittlerer Dichte; Gefäße enggestellt	kA	
+	kA	OU Papille atrophisch, spontaner Venenpuls; Drusen; Makulaödem; scheckige Funduspigmentierung; peripher Knochenkörperchen; chorioretinale Atrophie	kA	<u>0976.01</u> w 1984 RP
+	kA	OU Gefäße eng; RPE-Verschiebungen und –Verklumpungen	Konsang. (Eltern sind Verwandte 4. Grades)	<u>1046.01</u> w 1986 RP
kA	kA	kA	kA	<u>1212.01</u> m 1997 LCA
kA	kA	OU leichte peripapilläre Hyperpigmen- tierung	kA	
kA	OD +3,0/-1,0/150° OS +3,0/-1,0/10°	OU Papille blass; Aderhaut regional aufgehellt	kA	<u>1295.01</u> m 2003 RP
kA	OD -4,0 sph. OS -3,0 sph.	OU Papille blass; MWR fehlt	kA	<u>1399.01</u> m 2002 Ret. Dyst.
kA	OD +9,0/-0,5/0° OS +9,0/-0,5/0°	OU Papille aufgehellt; kein Foveolarreflex; PE wirkt körnelig unruhig	kA	<u>1423.01</u> w 2001 LCA
kA	OD +2,0/-0,5/5° OS +1,5/-1,0/140°	OU am hinteren Pol ausgeprägter zellophan- artiger Reflex; diskrete PE-Dilution	kA	<u>1603.01</u> w 1999 Ret. Dyst.
kA	kA	OU Papille temporal blass; MWR abgeschwächt; fleckige Depigmen- tierungen des RPE; Gefäße eng.	Bruder ebenfalls betroffen	

[Legende zu Tabelle 3-6 von S. 54 bis S. 57:]

++ stark ausgeprägt, + vorhanden, ↓ reduziert, ↓↓ stark reduziert, Ø nicht vorhanden, / keine Angabe

⊕ Strabismus convergens, ⊖ Strabismus divergens

↔ horizontaler Nystagmus, ↑ vertikaler Nystagmus

bin = binokular, cc = cum correctione, HBW = Handbewegungen, LEA = LEA-Symbole,
m = männlich, Mo = Monate, MWR = Makulawallreflex, OD = Oculus dexter, oB = ohne Befund,
OS = Oculus sinister, OU = Oculi utriusque, p = photopisch, P = Pendelnystagmus, R = Ruck-
nystagmus, s = skotopisch, sc = sine correctione, w = weiblich

Tabelle 3-6: Patientengruppe 1b (10 Patienten)

3.1.1.3. Patientengruppe 1c

Auswahl von Patientengruppe 1c

Zusätzlich zu den Patienten, deren Daten in den Tabellen 3-5 und 3-6 dargestellt sind, wurden noch 33 weitere Fälle schwerer hereditärer Netzhautdystrophien auf Mutationen im *RD3*-Gen untersucht. Dabei handelte es sich um Betroffene, deren klinische Befunde nicht den für Patientengruppe 1a und 1b definierten Kriterien entsprachen. Dieses als Patientengruppe 1c bezeichnete Kollektiv beinhaltete:

- Patienten mit einem weniger massiven Krankheitsverlauf (hinsichtlich Visus und ERG) als die Betroffenen der Patientengruppen 1a und 1b,
- Patienten, deren früheste vorliegende Befunde erst in einem höheren Lebensalter erhoben wurden als gefordert, sodass sie keinen soliden Rückschluss auf die Entwicklung der Netzhautdegeneration im Säuglingsalter zulassen,
- Patienten, zu denen nur sehr spärliche klinische Daten vorliegen, da sie von externen Untersuchern in das Projekt eingeschleust wurden.

Diese unter Patientengruppe 1c zusammengefassten Fälle sind in Tabelle 3-7 dargestellt. Da hierbei das Vorliegen einer schweren erblich bedingten Netzhautdegeneration mit bislang ungeklärter genetischer Ursache als einziges Auswahlkriterium galt, wurde auf eine detaillierte Darstellung der zu diesem Kollektiv vorliegenden klinischen Befunde an dieser Stelle verzichtet.

Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 1c)

DNA-Nr.	Geschlecht	Diagnose	DNA-Nr.	Geschlecht	Diagnose
0196.01	m	CRD	0474.01	w	RP
1361.01	m		1141.01	w	
1742.01	w		1164.01	m	
1797.01	m		1269.01	m	
2065.01	w		1331.01	w	
2352.01	m		1440.01	m	
1427.01	m	EOSRD	1585.01	m	
1675.01	m		1645.01	m	
1746.01	w		1776.01	m	
1911.02	m		0207.01	m	COD
1964.01 ^{NGS}	w		0970.01	w	RCD
2362.01 ^{NGS}	m		0173.01	w	andere Diagnosen
2419.01 ^{NGS}	m	LCA	0382.01	m	
0277.01	w		1512.01	w	
0905.01	m		2457.01	m	
1447.01	w				
1902.01	w				
2096.01	w				

^{NGS} Bei diesen drei Patientenproben wurde das *RD3*-Mutationsscreening nicht nach dem in Abschnitt 2.3. beschriebenen Verfahren im Labor für Molekulare Ophthalmologie in Gießen durchgeführt, sondern in dessen Auftrag durch die Bioscientia GmbH, Ingelheim im Rahmen einer Übersichtsuntersuchung auf bekannte LCA-Gene (NGS = Next Generation Sequencing).

Tabelle 3-7: Patientengruppe 1c (33 Patienten)

3.1.2. Patienten mit bereits identifizierten Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (Patientengruppe 2)

Auswahl von Patientengruppe 2

Wie in Abschnitt 1.3.1. dargestellt wurde, konnte durch unterschiedliche histologische und biochemische Verfahren eine Interaktion des RD3-Proteins mit der retinalen Guanylatzyklase (RetGC1 = Genprodukt des *GUCY2D*-Gens) auf subzellulärer Ebene nachgewiesen werden. Aus den dazu vorliegenden Studien geht hervor, dass das RD3-Protein eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport der Guanylatzyklase sowie bei der Regulation ihrer Aktivität spielt. [8,78]

Auf der Grundlage dieser molekularbiologischen Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen im *RD3*-Gen die Rolle eines genetischen „Modifiers“ bei Patienten mit *GUCY2D*-Mutationen spielen können. Nach dieser Überlegung würde der Phänotyp (also das klinische Bild) der *GUCY2D*-Patienten demnach durch zusätzliche Mutationen im *RD3*-Gen (und der daraus resultierenden gestörten Funktion des RD3-Proteins) beeinflusst. Weitere Gedanken zu dieser Hypothese sind im Diskussionsteil (4.1.3.) aufgegriffen.

Unter der Annahme eines solchen genetischen „Modifying“ wurden 23 in der Patientendatenbank der Gießener Augenklinik erfasste Patienten, bei denen bereits Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen identifiziert werden konnten, auf zusätzliche Mutationen im *RD3*-Gen untersucht (Patientengruppe 2). Bei 17 dieser 23 Patienten handelte es sich um Fälle mit Netzhautdystrophie, die ursächlich auf Mutationen im *GUCY2D*-Gen zurückzuführen waren: 14 dieser Patienten wiesen autosomal-rezessive Mutationen in homozygoter (oder Compound-heterozygoter) Form auf (LCA Typ 1), bei 3 Patienten lagen autosomal-dominante Mutationen in heterozygotem Zustand vor (CRD). Die übrigen 6 der 23 Patienten in Gruppe 2 zeigten dagegen lediglich solche Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (wie benigne Polymorphismen oder heterozygote rezessive Mutationen), die nach derzeitigem Kenntnisstand nicht als Ursache einer Netzhautdystrophie gewertet werden können (nicht konkludente Sequenzänderungen).

Die DNA-Nummern der untersuchten 23 Patienten sind in den Tabellen 3-8a und 3-8b festgehalten.

Ergebnis der Patientenauswahl (Patientengruppe 2)

(a) Patienten mit krankheits- ursächlichen <i>GUCY2D</i> -Mutationen			(b) Patienten mit nicht konkludenten Sequenzänderungen im <i>GUCY2D</i> -Gen		
DNA-Nummer	Geschlecht	Diagnose	DNA-Nummer	Geschlecht	Diagnose
0476.01	w	LCA 1	0829.01	unbekannt	LCA
0522.01	w	LCA 1	1080.01	m	RP
0559.01	m	LCA 1	1153.01	m	LCA
0894.01	w	LCA 1	1218.02	w	LCA
0922.01	m	LCA 1	1241.01	m	LCA
0993.01	m	LCA 1	1986.01	m	LCA
1003.01	w	LCA 1			
1067.01	w	LCA 1			
1218.01	m	LCA 1			
1386.01	w	LCA 1			
1407.01	w	LCA 1			
1439.01	w	LCA 1			
1511.01	m	LCA 1			
1584.01	m	CRD			
1829.01	m	CRD			
1839.01	m	CRD			
2118.01	m	LCA 1			

Tabellen 3-8: Patientengruppe 2: 23 Patienten mit Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen

3.2. Molekulargenetische Ergebnisse des Mutationsscreenings

Die Nomenklatur der identifizierten Sequenzänderungen folgt den Vorgaben des Human Gene Mutation Nomenclature Committee (HGNC, <http://www.genenames.org/guidelines.html>) und sind über die Mutalyzer Website (<https://mutalyzer.nl/check>) verifiziert worden.

Bei dem durchgeführten Mutationsscreening wurden DNA-Proben von insgesamt 88 Patienten untersucht. Dabei konnten bei 34 Personen Sequenzänderungen im *RD3*-Gen aufgedeckt werden. Es handelt sich dabei um 7 verschiedene Polymorphismen:

- c.5A>T (p.H2L)
- c.141C>T (p.R47C)
- c.170G>T (p.G57V)
- c.296+28G>A
- c.297-86A>T
- c.297-124G>A
- c.486C>T.

Diese 7 verschiedenen Polymorphismen verteilen sich in unterschiedlicher Häufigkeit auf die 34 identifizierten Patienten. Bei 5 Patienten wurden gleichzeitig zwei Polymorphismen nachgewiesen. Eine detaillierte Darstellung zur Verteilung der Sequenzänderungen innerhalb des Patientenkollektivs findet sich in den Tabelle 3-9 bis 3-11.

Polymorphismus	Anzahl der Nachweise	Patienten	
		DNA-Nummern	Patientengruppe
c.297-86A>T	21 davon 4 homozygot	0173.01	1c
		0277.01	1c
		0476.01	2
		0522.01	2
		0829.01	2
		0903.01	1a
		0993.01	2
		1080.01 (ho)	2
		1135.01 (ho)	1a
		1269.01	1c
		1295.01 (ho)	1b
		1427.01	1c
		1511.01	2
		1512.01	1c
		1567.01	1a
		1584.01	2
		1774.01	1a
		1776.01	1c
		1825.01 (ho)	1a
		1852.01	1a
		2457.01	1c
c.297-124G>A	10	0894.01	2
		1067.01	2
		1119.01	1a
		1164.01	1c
		1407.01	2
		1776.01	1c
		1797.01	1c
		1829.01	2
		1839.01	2
		1911.02	1c
c.141C>T (p.R47C)	4	0173.01	1c
		1046.01	1b
		1584.01	2
		2118.01	2
c.5A>T (p.H2L)	1	1630.03	1a
c.170G>T (p.G57V)	1	0667.01	1a
c.296+28G>A	1	0903.01	1a
c.486C>T (p.F160F)	1	1797.01	1c

ho = homozygot

Tabelle 3-9: Verteilung der Polymorphismen innerhalb des Patientenkollektivs

Patientengruppe	Patienten	Patienten mit Polymorphismus	Anzahl der gefundenen Polymorphismen
1	65	21 (32,3 %)	25
1a	22	9 (40,9%)	10
1b	10	2 (20,0%)	2
1c	33	10 (30,3%)	13
2	23	13 (56,5%)	14
Summe	88	34 (38,6%)	39

Tabelle 3-10: Verteilung der Polymorphismen nach Patientengruppen

Geschlecht	Patienten	Patienten mit Polymorphismus	Anzahl der gefundenen Polymorphismen
männlich	47	21 (44,7%)	25
weiblich	40	12 (30,0%)	13
unbekannt	1	1 (100,0%)	1
Summe	88	34 (38,6%)	39

Tabelle 3-11: Verteilung der Polymorphismen nach Geschlecht

Diagnose	Patienten	Patienten mit Polymorphismus	Anzahl der gefundenen Polymorphismen
LCA	46	18 (39,1%)	18
EOSRD	10	3 (30,0%)	4
RP	14	6 (42,9%)	7
CRD	10	4 (40,0%)	6
RCD	1	0	0
COD	1	0	0
Retinale Dystrophie	2	0	0
andere Diagnosen	4	3 (75%)	4
Summe	88	34 (38,6%)	39

Tabelle 3-12: Verteilung der Polymorphismen nach in der Datenbank erfassten Diagnosen

Herkunft	Patienten	Patienten mit Polymorphismus	Anzahl der gefundenen Polymorphismen
Mitteleuropa (deutschsprachiger Raum) ¹	51	17 (33,3%)	21
Türkei	17	7 (41,2%)	8
Ost- und Südosteuropa ²	6	2 (33,3%)	2
Nordeuropa ³	5	5 (100%)	5
Südeuropa ⁴	3	0	0
Nordafrika	3	1 (33,3%)	1
andere Herkunft	3	2 (66,6%)	2
Summe	88	34 (38,6%)	39

¹ Patienten aus Deutschland, Österreich und der Schweiz

² Patienten aus Tschechien, Polen, Ungarn und den Nachfolgestaaten des ehemaligen Jugoslawiens

³ Patienten aus skandinavischen Ländern

⁴ Patienten aus Italien

Tabelle 3-13: Verteilung der Polymorphismen nach der Herkunft der Patienten

Die gefundenen Sequenzänderungen stellen nach derzeitigem Kenntnisstand keine (krankheitsverursachenden) Mutationen dar, sondern sind als Polymorphismen (im Sinne funktionell nicht nachteiliger Abweichungen) zu deuten.

Die bisher bekannten Fälle, in denen *RD3*-Mutationen als Ursache von LCA identifiziert werden konnten, zeigten einen autosomal-rezessiven Erbgang. Alle Betroffenen dieser Familien wiesen homozygote Mutationen im *RD3*-Gen auf, während bei gesunden Angehörigen dort entweder nur heterozygote oder gar keine Sequenzänderungen gefunden werden konnten. Außerdem ist ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus auch aufgrund der Stammbaumanalyse anzunehmen. [30,79]

Somit musste auch für das im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Mutationsscreening davon ausgegangen werden, dass die (durch *RD3*-Mutationen bedingte) LCA Typ 12 autosomal-rezessiv vererbt wird. Folglich können nur homozygote (bzw. Compound-heterozygote) Sequenzänderungen zu einer manifesten Erkrankung führen.

Liegen die Abweichungen lediglich in heterozygoter Form vor, können sie nicht als Ursache im jeweiligen Erkrankungsfall angesehen werden. Im Falle von Heterozygotie existiert auf dem homologen Chromosom 1 noch ein intaktes Allel des *RD3*-Gens, welches bei dem vorliegenden autosomal-rezessiven Erbgang eine *RD3*-bedingte LCA verhindert.

Bei Sequenzänderungen innerhalb eines Introns (also im Bereich nicht-kodierender Genabschnitte), führt ein Basenaustausch in der Regel nicht zu Abweichungen in der translatierten Proteinsequenz, da die ihnen entsprechenden mRNA-Abschnitte bereits vor der Translation durch Spleißen entfernt werden (vorausgesetzt, die für das Spleißen selbst verantwortlichen Sequenzabschnitte bleiben unverändert).

Für die gefundenen Kombinationen der einzelnen Polymorphismen ergibt sich damit:

gefundene Kombination von Polymorphismen bei jeweils einem Patienten		Anzahl der Patienten mit dieser Kombination	Erläuterung
c.5A>T (p.H2L) <i>heterozygot</i>		1	Diese fünf Sequenzänderungen liegen in heterozygoter Form vor, finden sich also nur auf einem der beiden Allele.
c.141C>T (p.R47C) <i>heterozygot</i>		2	
c.170G>T (p.G57V) <i>heterozygot</i>		1	
c.297-86A>T <i>heterozygot</i>		13	
c.297-124G>A <i>heterozygot</i>		8	
c.297-86A>T <i>homozygot</i>		4	Bei vier Patienten wurde diese homozygote Sequenzänderung gefunden. Es handelt sich bei ihr jedoch um eine Veränderung in einem Intron (also im nicht für die Aminosäuresequenz des Proteins kodierenden Bereich) und dort außerhalb der für das Spleißen relevanten Elemente.
c.141C>T (p.R47C) <i>heterozygot</i>	c.297-86A>T <i>heterozygot</i>	2	Bei all diesen Kombinationen wäre (vorausgesetzt die beiden Veränderungen verteilten sich jeweils auf beide Allele) eine Compound-Heterozygotie denkbar, bei der aus beiden Allelen kein funktionstüchtiges Genprodukt resultieren würde. Da allerdings in jedem der hier beschriebenen Fälle mindestens eine der beiden Sequenzänderungen tief im Intronbereich liegt und somit für die Aminosäuresequenz des Proteins irrelevant ist, kann auch die Erkrankungsursache dieser Patienten nicht im <i>RD3</i> -Gen liegen. Bei dem hier vorliegenden autosomal-rezessiven Erbgang steht somit in jedem Fall mindestens ein intaktes Genprodukt zur Verfügung.
c.296+28G>A <i>heterozygot</i>	c.297-86A>T <i>heterozygot</i>	1	
c.297-124G>A <i>heterozygot</i>	c.297-86A>T <i>heterozygot</i>	1	
c.297-124G>A <i>heterozygot</i>	c.486C>T (p.F160F) <i>heterozygot</i>	1	

Tabelle 3-14: Erläuterungen zu den gefundenen Kombinationen von Polymorphismen

Der Polymorphismus c.141C>T (p.R47C) konnte bereits im Rahmen einer anderen Studie zu *RD3*-Mutationen beobachtet werden: Friedman et al. beschrieben ihn als eine von mehreren gefundenen heterozygoten Sequenzänderungen, die sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe zu finden waren und in den betroffenen Familien nicht parallel zu den Erkrankungsfällen vererbt wurden. [30] Somit kann diese Sequenzabweichung als eine benigne Veränderung eingestuft werden.

Auch der Polymorphismus c.170G>T (p.G57V) wurde zuvor schon in der Arbeit von Friedman et al. gefunden: Dort wird eine skandinavische Patientin mit hinsichtlich Netzhautdystrophien leerer Familienanamnese beschrieben, die ab einem Alter von 6 Jahren an Sehproblemen litt. Ihre Erkrankung konnte aufgrund von zu späteren Zeitpunkten durchgeführten ERG-Ableitungen als Zapfen-Stäbchen-Degeneration klassifiziert werden. Auch im Alter von 19 Jahren waren bei dieser Patientin noch messbare, wenn auch reduzierte Antworten im ERG abzuleiten. Der Visus betrug zu diesem Zeitpunkt 20/200 ($\cong 0,1$), wobei auf beiden Augen ein Zentralskotom bestand. [30] Das späte Manifestationsalter und der Verlauf der Erkrankung bei dieser Patientin passen nicht zu dem phänotypischen Bild der bisher beschriebenen *RD3*-Fälle. Der hier vorliegende Polymorphismus p.G57V (c.170G>T) ist somit als Erkrankungsursache unwahrscheinlich.

4. Diskussion

4.1. Einordnung der vorliegenden Arbeit in den derzeitigen Wissensstand

4.1.1. Generelle Abgrenzung des Beitrages gegenüber anderen Studien

Die Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) ist eine Form von frühkindlicher hereditärer Netzhautdystrophie. [7] Bisher konnten Mutationen in 23 verschiedenen Genen als mögliche Ursache dieser Erkrankung identifiziert werden. (<http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis/>)

Mutationen im *RD3*-Gen gehen dabei mit einem besonders schweren klinischen Verlauf einher. [30,79] Nach dem Wissenstand zu Beginn dieser Dissertation wurden weltweit erst zwei von LCA betroffene Familien beschrieben, in denen *RD3*-Mutationen als Erkrankungsursache diagnostiziert werden konnten. [30,79]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zu der Frage nach der Beteiligung von *RD3*-Mutationen an Fällen frühkindlicher Netzhautdegenerationen zu leisten und eventuell weitere Erkrankungsfälle aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Dissertation 88 gezielt ausgewählte Patienten mit schweren hereditären Netzhautdystrophien (davon 23 Patienten mit bereits bekannten Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen) auf Mutationen im *RD3*-Gen untersucht.

In der Literatur wurden bereits Untersuchungen an 1.408 Patienten mit verschiedenen Retinopathien berichtet [30][42][51][54]. Diese Patienten stammten aus Großbritannien, Indien, dem Libanon, Nordafrika, Nordamerika, Saudi-Arabien, Skandinavien, Südeuropa und der Türkei. Dabei konnten zwei Geschwister indischer Abstammung sowie mehrere Familien aus Algerien, dem Libanon, Marokko und der Türkei mit ursächlichen Mutationen verknüpft werden [30][42].

Die Aussagen dieser Studie stehen nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit.

Die zum Teil sehr umfangreichen Patientenkollektive, die im Rahmen der oben genannten Studien von Lavorgna et al., Friedman et al. und Li et al. untersucht wurden, umfassten Fälle von Netzhautdystrophien, die ausschließlich nach dem Kriterium

„Diagnose“ ausgewählt wurden. [30,51,54] So wurden bei Lavorgna et al. Patienten mit der Diagnose Retinopathia pigmentosa, bei Li et al. solche mit LCA untersucht. [51,54] In die Studie von Friedman et al. wurden Patienten mit unterschiedlichsten Retinopathie-Formen eingeschlossen (Retinopathia pigmentosa simplex bzw. multiplex, juvenile Retinopathia pigmentosa, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, Zapfendystrophie, LCA, Fundus albipunctatus, Makuladegeneration, Morbus Stargardt, autoimmune Retinopathie, Achromatopsie, kongenitale stationäre Nachtblindheit u. a.). [30] Die Patientenkollektive dieser bisherigen Studien (insbesondere der letztgenannten) waren demzufolge bezüglich ihrer Einschlusskriterien eher breitgefächert angelegt. [30,51,54]

Die Besonderheit des in der vorliegenden Studie untersuchten Patientenkollektivs liegt darin, dass hier aus einer großen Anzahl von Netzhautdystrophie-Fällen (mit passenden Diagnosen) vorzugsweise solche in das Screening eingeschlossen wurden, die nach zuvor festgelegten phänotypischen bzw. genotypischen Kriterien ausgewählt wurden. Hinter diesen – nach theoretischen Überlegungen formulierten – Kriterien steckte die Absicht, die Trefferwahrscheinlichkeit für *RD3*-Mutationen in einem derart eingegrenzten Kollektiv zu erhöhen.

Die jeweiligen Vorstellungen, die diesen (phänotypisch bzw. genotypisch begründeten) Auswahlkriterien zu Grunde lagen, werden in den folgenden Abschnitten 4.1.2. und 4.1.3. erläutert und diskutiert. Wie bereits oben (unter 1.4. Zielsetzung und 3. Ergebnisse) dargelegt wurde, gliederte sich das Patientenkollektiv dieser Studie in zwei Gruppen, die nach unterschiedlichen Gesichtspunkten aus einer Datenbank ausgewählt wurden (Patientengruppen 1 und 2). Diese Untergliederung wird auch im Diskussions- teil beibehalten.

Ein weiterer Aspekt, der das (gesamte) von uns untersuchte Patientenkollektiv von dem anderer Studien unterscheidet, ist seine ethnische Zusammensetzung. Es ist bekannt, dass die Allelfrequenzen der genetischen Variationen je nach Herkunft der Menschen variieren. [13] Solche Variationen sind naturgemäß auch bei der Häufigkeitsverteilung krankheitsverursachender Mutationen auf verschiedene Gene wiederzufinden, z. B. bei der LCA. So konnten etwa Li et al. im Rahmen der oben erwähnten Screening-Untersuchung saudi-arabischer LCA-Patienten feststellen, dass lediglich 24 % der Erkrankungsfälle ihres Patientenkollektivs auf Mutationen in den damals bereits bekannten (und von ihnen untersuchten) 13 LCA-Genen zurückzuführen waren – im Gegensatz zu

65 % in der europäischen Bevölkerung. [54] Schon dieser Umstand zeigt, dass die Häufigkeit, mit der Mutationen in den einzelnen (derzeit 23 bekannten) LCA-Genen ursächlich für die LCA sind, in unterschiedlichen Teilen der Welt durchaus verschieden ist. [54]

Die Screeninguntersuchung der vorliegenden Dissertation wurde in der Annahme durchgeführt, dass konsequenterweise auch die Häufigkeit von *RD3*-Mutationen von der ethnischen Zusammensetzung des untersuchten Patientenkollektivs abhängen könnte. Die oben genannten *RD3*-Screeninguntersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurden an Patientenkollektiven unterschiedlicher ethnischer Herkunft durchgeführt: In die Studie von Friedman et al. wurden Betroffene aus Nordamerika (461 Patienten), Indien (103 Patienten), Großbritannien (302 Patienten) und Skandinavien (15 Patienten) eingeschlossen. [30] Li et al. forschten an einer saudi-arabischen Population. [54] Bei den von Lavoragna et al. untersuchten Fällen handelte es sich vermutlich v. a. um in Italien beheimatete Patienten. [51]

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv setzte sich im Wesentlichen aus Patienten mitteleuropäischer (58 %) und türkischer (19 %) Herkunft zusammen (s. Tabelle 3-4). Bei dem hier durchgeführten *RD3*-Screening handelte es sich folglich um die (nach unserem derzeitigen Kenntnisstand) erste Untersuchung dieser Art an einem Patientengut aus dem deutschsprachigen Raum sowie an einem türkischstämmigen Patientengut. Es war daher davon auszugehen, dass die hierbei vorliegende (von den bisherigen Studien abweichende) ethnische Zusammensetzung unseres Patientenkollektivs einen möglichen Einflussfaktor auf die Zahl der vorkommenden *RD3*-Fälle darstellte, der allerdings nicht gezeigt werden konnte.

4.1.2. Patientengruppe 1

Besonderheiten der Zusammensetzung von Patientengruppe 1

Wie bei zahlreichen anderen Erbkrankheiten besteht auch bei der LCA zum Teil eine Beziehung zwischen dem jeweiligen mutierten Gen und dem daraus resultierenden klinischen Bild (Genotyp-Phänotyp-Korrelation). Für andere LCA-Gene wie *GUCY2D*, *RPE65*, *CRB1* und *CRX* konnten derartige Abhängigkeiten des klinischen Bildes bereits in anderen Studien gezeigt werden (s. Tabelle 1-2). In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein einer solchen Genotyp-Phänotyp-Korrelation auch für *RD3*-Patienten angenommen. Es wurden daher gezielt solche Netzhautdystrophie-Patienten für das Mutationsscreening ausgewählt, die den bereits beschriebenen *RD3*-Fällen in ihren klinischen Befunden möglichst ähnelten. [30,79]

Bei den 2012 von Preising et al. beschriebenen Patienten kurdischer Abstammung, die im Abschnitt 1.3.4. vorgestellt wurden, handelt es sich nach derzeitigem Kenntnisstand um die zweite beschriebene LCA-Familie mit zu Grunde liegender *RD3*-Mutation. Sechs Mitglieder dieser konsanguinen Großfamilie waren von einer schweren LCA betroffen, deren genetische Ursache nach dem Ausschluss anderer LCA-Gene zunächst ungeklärt blieb. Durch Kopplungsanalysen gelang es, das *RD3*-Gen als Ursprung dieser Erkrankungsfälle zu lokalisieren. Bei der anschließenden Sequenzierung des *RD3*-Gens konnte daraufhin bei allen sechs Patienten das Vorliegen der homozygoten Stoppmutation c.180C>A (p.Y60X) als Krankheitsursache gezeigt werden. [79]

Das konkrete Interesse an einem Mutationsscreening im *RD3*-Gen und damit die Idee für die vorliegende Arbeit ergaben sich aus der Identifikation und Beschreibung dieser LCA-Familie. Da diese Dissertation folglich gewissermaßen eine gedankliche Fortsetzung der Studie von Preising et al. darstellt, orientierten sich die Auswahlkriterien für unser Patientenkollektiv vor allem an der detaillierten phänotypischen Charakterisierung der sechs *RD3*-Patienten, wie sie aus jener Studie hervorgeht. [79].

Eine solche Eingrenzung des Untersuchungskollektivs aus Patienten, die gemäß einer angenommenen Genotyp-Phänotyp-Korrelation das von uns erwartete *RD3*-typische klinische Bild zeigten, ist in dieser Arbeit erstmalig realisiert worden. Dieses Vorgehen erfolgte in der Absicht, die Wahrscheinlichkeit, *RD3*-Mutationen zu finden, durch eine derart gezielte Auswahl der Fälle zu erhöhen.

In den Patientengruppen 1a und 1b wurden solche Fälle zusammengefasst, die – unter der Annahme einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei *RD3*-Patienten – nach definierten klinischen Kriterien hinsichtlich Visus und ERG ausgewählt wurden. Darüber hinaus wurden als Patientengruppe 1c weitere schwere Netzhautdystrophie-Fälle auf *RD3*-Mutationen untersucht, deren Phänotyp nicht diesem strengen Schema eines klinischen Bildes entsprach. Dies erschien sinnvoll, da unsere bisherigen Informationen über den mutmaßlich für *RD3* charakteristischen Phänotyp ausschließlich auf der Beschreibung zweier Familien weltweit basierten. [30,79] Es ist aber wohl zu erwarten, dass sich nicht alle *RD3*-Patienten mit dem exakt gleichen klinischen Bild präsentieren. Möglicherweise beeinflusst auch die Konstellation in anderen Genen (sogenannten „Modifiern“) die Ausprägung des *RD3*-Phänotyps, sodass auch hinsichtlich ihres *RD3*-Gen-Status identische Individuen eine unterschiedliche Klinik aufweisen könnten. Diesen Gedanken legen zumindest die Ergebnisse verschiedener Studien an *rd3*-Mäusen (dem Tiermodell der humanen *RD3*-bedingten LCA) nahe, die in Abschnitt 1.3.2. bereits erörtert wurden. [18,30,55] Bei diesen *rd3*-Mäusen fiel schon relativ früh auf, dass die bei den einzelnen Individuen erhobenen Befunde nicht identisch waren, sondern zwischen verschiedenen Unterstämmen variierten. [30,38,55] Der Einfluss verschiedener Gene, die für die phänotypische Variabilität der *rd3*-Mäuse verantwortlich sind, ist mittlerweile gesichert. [18] Überträgt man dieses Modell auf die Situation des humanen *RD3*-Gens, lässt sich auch hier eine gewisse phänotypische Variabilität durch genetische „Modifizier“ vermuten, was die Suche nach *RD3*-Mutationen auch bei Patienten außerhalb des zunächst engen Rasters rechtfertigte.

Das Ergebnis dieser Studie zeigt allerdings, dass die Prävalenz der *RD3*-assoziierten Netzhauterkrankungen grundsätzlich extrem selten ist. Aufgrund der geringen Fallzahlen ist auch eine sinnvolle Bewertung von modifizierenden Mutationen in anderen Genen nicht durchführbar.

Molekulargenetische Besonderheiten bei Patientengruppe 1

Letztlich konnten bei dem durchgeführten *RD3*-Mutationsscreening innerhalb der Patientengruppe 1 zahlreiche Polymorphismen in heterozygoter Form sowie in einigen Fällen homozygote Sequenzänderungen in Intronbereichen identifiziert werden. Mutationen, die als Erkrankungsursache der betroffenen Patienten zu interpretieren wären, wurden jedoch nicht gefunden. Diese Bilanz bestätigt, dass Mutationen im *RD3*-Gen als eine sehr seltene Ursache der LCA anzusehen sind.

Ein solches Ergebnis steht durchaus im Einklang mit den Resultaten vorausgehender Studien anderer Arbeitsgruppen, die sich mit dieser Thematik befasst haben. Auch in diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es sich bei Fällen *RD3*-bedingter LCA um Raritäten handelt. [30,51,54]

Ferner zeigte sich auch in jüngst mittels Next Generation Sequencing (NGS) durchgeführten Mutationsscreening-Untersuchungen bei LCA-Patienten, dass *RD3*-Mutationen nur extrem selten vorkommen. NGS ist eine methodische Weiterentwicklung des Gensequenzierungsverfahrens und stellt inzwischen eine schnelle und kostengünstige Technik zur Durchführung von Mutationsscreenings zur Verfügung, bei der zahlreiche LCA-Gene (u. a. auch *RD3*) gleichzeitig untersucht werden können. Im Rahmen eines solchen LCA-Screening-Projekts bei 105 Patienten (durchgeführt bei Bioscientia GmbH, Ingelheim), an dem das Labor für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen beteiligt war, konnten ebenfalls keine weiteren *RD3*-Patienten identifiziert werden. (Veröffentlichung in Vorbereitung)

4.1.3. Patientengruppe 2

Besonderheiten der Zusammensetzung von Patientengruppe 2

Bei den in Gruppe 2 untersuchten Patienten handelte es sich um Fälle mit bereits identifizierten Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (überwiegend Fälle von LCA Typ 1, d. h. Fälle mit krankheitsverursachenden Mutationen im *GUCY2D*-Gen). Basierend auf dem Wissen über die molekularen Wechselwirkungen des RD3-Proteins (Genprodukt des *RD3*-Gens) mit der retinalen Guanylatzyklase (Genprodukt des *GUCY2D*-Gens), die in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnten [8,78], hielten wir eine modulierende Aktivität zusätzlicher *RD3*-Mutationen auf den Krankheitsverlauf bei LCA Typ 1-Patienten für möglich.

Die grundlegenden Erkenntnisse zur subzellulären Lokalisation und Funktion des RD3-Proteins sowie zu seiner Interaktion mit der retinalen Guanylatzyklase gehen im Wesentlichen auf die Forschungstätigkeiten von Azadi et al. und Peshenko et al. zurück. In diesen Studien konnte (am Mausmodell) gezeigt werden, dass das RD3-Protein eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport der Guanylatzyklase sowie bei der Regulation ihrer Aktivität spielt. Der Inhalt dieser beiden Arbeiten stellte somit die molekulare Grundlage für die in dieser Dissertation postulierten Überlegungen zu einem genetischen „Modifying“ des klinischen Bildes von *GUCY2D*-Patienten durch zusätzliche *RD3*-Mutationen dar. Die Versuche von Azadi et al. und Peshenko et al. wurden im Abschnitt 1.3.1. bereits vorgestellt.

Die retinale Guanylatzyklase (RetGC) dient der Produktion des Second Messengers cGMP im Außensegment der Photorezeptoren. Dieser Vorgang ist nötig, um nach einer Erregung der Sinneszelle durch Lichtquanten und der darauffolgenden intrazellulären Signaltransduktion, die zu einem Absinken des cGMP-Spiegels führt, den Ruhezustand des Stäbchens oder Zapfens wiederherzustellen (vgl. Abschnitt 1.3.1). [8] Die RetGC wird zunächst im Innensegment der Photorezeptorzelle synthetisiert und muss anschließend an ihren Einsatzort, das Außensegment, verbracht werden. Die in Abschnitt 1.3.1. dargestellten Erkenntnisse der Arbeit von Azadi et al. legen nahe, dass RD3 an der korrekten Expression von RetGC1 und 2 sowie an deren Export vom ER in die Transportvesikel beteiligt ist. Vermutlich kommt es im Falle des Fehlens von RD3 stattdessen zu einem raschen Abbau der synthetisierten RetGC-Moleküle. Diese Störung würde den

nachweisbar erniedrigten RetGC-Gehalt in den Außensegmenten von *rd3*-Mäusen erklären. [8]

Überträgt man die dargestellten Befunde vom Mausmodell auf den Menschen, erklärt die mutmaßliche physiologische Funktion von RD3 nicht nur gut die bestehenden phänotypischen Ähnlichkeiten von *rd3*- und GC(1/2) double knockout-Mäusen, sondern auch die Vergleichbarkeit des klinischen Bildes von Patienten mit LCA 1 (*GUCY2D*-Mutationen) und LCA 12 (*RD3*-Mutationen). [8] Schließlich gelangt nach dieser Vorstellung durch die Abwesenheit des (intakten) „Transporthelfers“ RD3 die eigentlich funktionsfähige RetGC bei LCA 12 nicht an ihren Einsatzort im Außensegment, was der fehlenden Produktion der RetGC bei LCA 1 gewissermaßen funktionell gleichkommt. [8] Die bei LCA 12 (bzw. *rd3*-Mäusen) auftretende Nonsense-Mutation im *RD3*-Gen führt nämlich zu einem kompletten Verlust der Funktion des RD3-Proteins. [30,79] Tatsächlich ist eine schwere Visuseinschränkung seit der Geburt bzw. ein enormer Visusverlust bereits in den ersten Lebensmonaten und -jahren sowohl kennzeichnend für solche Patienten mit Mutationen im *GUCY2D*-Gen (vgl. Tabelle 1-2) als auch für die bisher beschriebenen *RD3*-Patienten (vgl. Abschnitt 1.3.1.). [30,79]

Peshenko et al. konnten außerdem zeigen, dass das RD3-Protein auch regulatorische Effekte auf die enzymatische Aktivität der Guanylatzyklase ausübt (vgl. Abschnitt 1.3.1.). [78] Die Guanylatzyklase und das RD3-Protein sind im Innensegment miteinander gekoppelt und bleiben es auch während ihrer Beförderung vom Innen- ins Außensegment. [8] Nach derzeitigem Kenntnisstand wird vermutet, dass dem RD3-Protein dabei die Aufgabe zufällt, die enzymatische Aktivität der RetGC während ihrer Reifung im Innensegment und ihres Transports ins Außensegment zu unterdrücken. [78] Dieser Mechanismus würde verhindern, dass es – in Abwesenheit von Guanylatzyklase-aktivierenden Proteinen (GCAP) – durch die Basisaktivität der Guanylatzyklase zu einer verfrühten Produktion des Second Messengers cGMP bereits im Innensegment kommt. [78]

Zu dieser Vorstellung passt auch die Tatsache, dass in früheren Studien bei *rd3*-Mausmodellen (also Mäusen ohne funktionsfähiges RD3-Protein) erhöhte intrazelluläre cGMP-Spiegel gemessen werden konnten. [103] Als Ursache dafür ist folglich erstens anzunehmen, dass die Basisaktivität der RetGC (durch den Defekt von RD3) nicht unterdrückt würde und es demnach zu einer unkontrollierten Produktion von cGMP käme. [78] Zweitens kommt hinzu, dass bei einem Ausbleiben des RD3-vermittelten

Transports der RetGC ins Außensegment diese cGMP-Produktion im Innensegment stattfinden, wo sich die Second Messenger-Moleküle anreichern würden, da sie nicht durch die eigentlich dafür verantwortliche Phosphodiesterase (die sich im Außensegment befindet) abgebaut würden. [78]

Im Gegensatz zu den Befunden von LCA 1-Patienten kommt es bei Mutationen im *RD3*-Gen zu früheren und heftigeren Störungen im Aufbau der Netzhaut, die durch optische Kohärenztomographie (OCT) nachweisbar sind. [79] Diese andersartigen Veränderungen, die insbesondere die Schichten der Außen- und Innensegmente sowie die dazwischenliegenden Verbindungszilien betreffen, finden sich in ähnlicher Weise auch in den histologischen Schnitten von *rd3*-Mäusen [18] und *rcd2*-Collies [84]. Solche morphologischen Unterschiede zwischen *GUCY2D*- und *RD3*-Patienten könnten darauf zurückzuführen sein, dass sich ein Mangel an cGMP (bei *GUCY2D*-Patienten) möglicherweise weniger schädigend auf die Photorezeptorzelle auswirkt als ein Übermaß dieses Second Messengers (durch fehlende Hemmung der Guanylatzyklase bei *RD3*-Patienten). [79] Weiterhin könnte aber auch die bloße Anwesenheit von (gleichwohl defekten) RetGC-Molekülen (bei *GUCY2D*-Mutationen) einen erhaltenden Effekt auf die Struktur der Netzhaut ausüben, wogegen ihre Abwesenheit in den Außensegmenten (bei *RD3*-Mutationen) womöglich zu deren Untergang beiträgt. [79]

Ein möglicher Erklärungsansatz, warum es durch das Fehlen von RD3 (bzw. auch das Fehlen von RetGC) generell nicht nur zu einer gestörten Funktion der Photorezeptoren kommt, sondern auch zu einer progredienten retinalen Degeneration, bezieht sich auf die Calcium-Homöostase der Photorezeptorzellen: In Folge des Mangels an Guanylatzyklase im Außensegment kommt es dort zu einem ständig erniedrigten cGMP-Spiegel, was die Leitfähigkeit der cGMP-gesteuerten Kationenkanäle in der Zellmembran reduziert. Dadurch liegt die intrazelluläre Calcium-Konzentration ständig auf einem zu niedrigen Niveau, was dem Langzeitüberleben der Photorezeptoren abträglich ist. [8]

All diese Forschungsergebnisse von Azadi et al. und Peshenko et al. über Interaktionen des RD3-Proteins mit der retinalen Guanylatzyklase waren für uns der Anlass, einen möglichen modifizierenden Einfluss von *RD3*-Mutationen auf das Krankheitsbild von LCA 1-Patienten zu postulieren. [8,78]

Molekulargenetische Besonderheiten bei Patientengruppe 2

Bei dem von uns durchgeführten *RD3*-Screening von 23 Patienten mit Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (darunter 14 Fälle mit autosomal-rezessiver LCA Typ 1 und 3 mit autosomal-dominanter Zapfen-Stäbchen-Dystrophie sowie 6 Fälle mit primär gutartigen *GUCY2D*-Polymorphismen) fanden sich jedoch ausschließlich die in Tabelle 3-9 dargestellten benignen Sequenzänderungen im *RD3*-Gen. [79] Diese entsprechen weitgehend der Serie von *RD3*-Polymorphismen, die bereits in Patientengruppe 1 identifiziert werden konnten. Ein Einfluss von *RD3*-Mutationen auf die Klinik von *GUCY2D*-Patienten (im Sinne eines genetischen „Modifying“) konnte demnach im hier untersuchten Kollektiv nicht nachgewiesen werden. [79]

Auffällig war dennoch der hohe Anteil an *GUCY2D*-Fällen, bei denen zusätzliche *RD3*-Polymorphismen gefunden werden konnten. Bei gut der Hälfte (13 von 23) der in Patientengruppe 2 untersuchten Netzhautdystrophie-Fälle konnten Sequenzänderungen im *RD3*-Gen festgestellt werden. Demgegenüber lag dieser Anteil bei den Patienten der Gruppe 1 lediglich bei knapp einem Drittel (21 von 65) der hier untersuchten Fälle. Ob dieser Sachverhalt in anderen Kollektiven in ähnlicher Weise zu finden ist und ob er eine pathogenetische Relevanz besitzt, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Auch über eine mögliche Bedeutung der im Gesamtkollektiv (88 untersuchte Patienten) gefundenen asymmetrischen Geschlechterverteilung hinsichtlich der aufgedeckten *RD3*-Polymorphismen (21 männliche versus 12 weibliche Patienten) bei halbwegs ausgeglichenem Geschlechterverhältnis der Stichprobe (47 männliche versus 40 weibliche Patienten) konnte gegenwärtig keine fundierte Aussage getroffen werden. Da es sich bei *RD3*-bedingter LCA um einen autosomal-rezessiven Erbgang handelt (und in der vorliegenden Arbeit ohnehin nur pathogenetisch nicht bedeutsame Sequenzänderungen gefunden wurden), wäre theoretisch ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis bezüglich der Zahl der Erkrankungsfälle und der Mutationsfrequenz zu erwarten.

4.2. Ausblick: Erforschung LCA-verursachender Gene als Voraussetzung für eine zukünftige Therapierbarkeit

Ca. 70 % der in der Literatur beschriebenen LCA-Fälle können durch Mutationen in den bisher bekannten 23 LCA-Genen erklärt werden. [58,97] Das bedeutet im Umkehrschluss, dass bei knapp einem Drittel der LCA-Patienten heute noch kein für ihre Erkrankung verantwortliches Gen identifiziert werden konnte. [58,97] Somit ist zu erwarten, dass hier noch weitere, bislang unbekannte LCA-Gene eine Rolle spielen, wobei durchaus mit mehreren Genen, die teilweise auch spezifisch für wenige betroffene Familien sein könnten, zu rechnen ist. [81] Auch unter den Mutationen, die im Verlauf der letzten Jahre erstmalig aufgedeckt werden konnten, befanden sich Genorte, die nur eine sporadisch zu findende Ursache frühkindlicher Netzhautdystrophien darstellten (z. B. *TULP1*, *LCA3*, *LCA5* und letztlich auch *RD3*). [30,33,79,81]

Die Identifizierung weiterer LCA-Gene sowie die Gewinnung von Aussagen zu ihrer Häufigkeit und die Erarbeitung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind zum einen als Teil der Grundlagenforschung über die Lebersche kongenitale Amaurose zu verstehen. Zum anderen ist diese konkrete Forschung aber auch zwingende Voraussetzung für eine zukünftige Anwendbarkeit der somatischen Gentherapie. [81] Diese neuartige Behandlungsoption könnte in den kommenden Jahren und Jahrzehnten in vielen Fällen eine kausale Therapie der lange als unheilbar geltenden hereditären Netzhautdystrophien zur Verfügung stellen. [91]

Im Rahmen der somatischen Gentherapie wird mit Hilfe einer Vektor-vermittelten „Substitution“ des mutierten Gens durch eine intakte Kopie die physiologische Zellfunktion wiederhergestellt. [3,81] Ein gentechnisch verändertes Virus (rAAV), welches das korrekte Allel (des im jeweiligen Fall mutierten Gens) trägt, transduziert (d. h. überträgt) dieses – nach subretinaler Injektion – auf die jeweiligen Zielzellen (Photorezeptoren oder Zellen des retinalen Pigmentepithels). [90,91] Hatte die krankheitsverursachende Mutation zu einem Verlust oder einer Verminderung der Proteinfunktion geführt (wie auch im Falle der Nonsense-Mutation bei *RD3*-Patienten), verrichtet nun das Genprodukt der transduzierten cDNA die physiologische Aufgabe des fehlerhaften zelleigenen Proteins („Gene addition“-Therapie). [90]

Die erfolgreiche Anwendbarkeit des Verfahrens der somatischen Gentherapie zur Behandlung von degenerativen Netzhauterkrankungen (durch Mutationen in unterschiedlichen LCA-Genen) konnte bereits in zahlreichen Studien an Tiermodellen

gezeigt werden. [2,3,10,11,19,35,40,50,52,69,70,72,73,91,93,94] Inzwischen liegen auch die ersten Ergebnisse solcher Studien zur gentherapeutischen Behandlung von *rd3*-Mäusen vor. [67]

Auch an menschlichen LCA-Patienten (mit *RPE65*-Mutationen) wurde die somatische Gentherapie im Rahmen klinischer Studien bereits mit Erfolg angewandt. [9,20,62,63,87] Die Ergebnisse einer solchen Arbeit zeigten Verbesserungen der Netzhautfunktion der behandelten Patienten, die mindestens über den in der entsprechenden Veröffentlichung geschilderten Beobachtungszeitraum von gut 2 Jahren hinweg anhielten. [20,62,87]

Wie in vorangehenden klinischen Studien zur somatischen Gentherapie bei Netzhauterkrankungen ebenfalls gezeigt werden konnte, scheint die Wirksamkeit des Verfahrens beim Menschen u. a. auch vom Alter des behandelten Patienten abhängig zu sein, wobei jüngere Patienten offensichtlich besser auf die Therapie ansprechen. [20,62,87,91] Hierdurch könnte bei den *RD3*-Patienten die Schwierigkeit auftreten, dass diese aufgrund ihres extrem frühen Krankheitsbeginns entsprechend schnell identifiziert und auch behandelt werden müssten. Schließlich ist in diesem Zusammenhang anzunehmen, dass die Wirksamkeit einer somatischen Gentherapie bei diesen Patienten am größten wäre, wenn sie eingesetzt würde, bevor die Mehrzahl der Netzhautzellen der völligen Degeneration zum Opfer gefallen ist.

Wie dargelegt, ist die Behandlung der LCA durch das Verfahren der somatischen Gentherapie derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Bei den bisherigen klinischen Studien stand die Therapie von Patienten mit Mutationen im *RPE65*-Gen im Mittelpunkt. [62,87] Es ist aber durchaus denkbar, die Anwendung des Verfahrens auch auf andere LCA-Gene (z. B. *RD3*) auszuweiten, wobei jedoch bis dato offenkundig noch gar nicht alle für die LCA ursächlichen Gene überhaupt bekannt sind. Bei einem Anteil von ca. 30 % der LCA-Patienten kann der Ursprung der Erkrankung nicht in Mutationen der bislang bekannten Gene gefunden werden, was bedeutet, dass die in diesen Fällen verantwortlichen Gene im Rahmen der bisherigen Forschung noch nicht identifiziert wurden. [58,97] Da die spezifische somatische Gentherapie aber nur unter der Bedingung angewandt werden kann, dass das jeweils ursächliche Gen bereits beschrieben ist, stellt die Erforschung dieser kausalen Gene (wie hier des *RD3*-Gens) auch in Zukunft eine große Herausforderung in der Ophthalmogenetik dar. [81]

4.3. Schlussgedanke

Das Ergebnis der vorliegenden Dissertation steht grundsätzlich im Einklang mit den Aussagen bisheriger Studien [30,42,51,54] sowie der einschlägigen Literatur [16,97]. Somit stellen Mutationen im *RD3*-Gen die Ursache einer schwer verlaufenden, aber extrem seltenen frühkindlichen Netzhautdystrophie dar. Die Erforschung des *RD3*-Gens ist – ebenso wie die anderer LCA-Gene – Grundlage für eine erfolgreiche Anwendung der somatischen Gentherapie und damit für die potentielle Therapierbarkeit dieser Erkrankung in der Zukunft.

5. Zusammenfassung

Die Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) ist eine Form der hereditären frühkindlichen Netzhautdystrophie. Bei den betroffenen Patienten kommt es bereits im frühesten Kindesalter zu schweren degenerativen Veränderungen der Retina, die zu einem beträchtlichen Visusverlust und stark verminderten Antworten im Elektretinogramm (ERG) führen.

Ca. 70 % der Erkrankungsfälle lassen sich durch die derzeit 23 bekannten Gene erklären, welche im Falle einer Mutation eine LCA verursachen. Mutationen im *RD3*-Gen werden autosomal-rezessiv vererbt und führen zu einem besonders schweren Krankheitsverlauf (LCA Typ 12). Die ersten *RD3*-Patienten konnten 2006 und 2012 beschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben eines systematisch ausgewählten Kollektivs von 88 Netzhautdystrophie-Patienten auf Mutationen im *RD3*-Gen untersucht, um eine Aussage zur Häufigkeit solcher Mutationen als Ursache der LCA zu treffen. Die in das Screening eingeschlossenen Patienten wurden dabei nach zwei unterschiedlichen Aspekten ausgewählt:

1. In der Annahme einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit *RD3*-Mutationen wurden aus der Datenbank des Labors für Molekulare Ophthalmologie in Gießen gezielt 32 Patienten (mit noch unbekannter Krankheitsursache) ausgewählt, die den bereits beschriebenen *RD3*-Patienten in ihren klinischen Befunden (insbesondere hinsichtlich Visusverlust und ERG) möglichst ähnelten, sowie weitere 33 Patienten mit schweren Netzhautdystrophien außerhalb dieses engen Rasters (Patientengruppe 1).
2. Ferner wurden 23 Patienten mit Sequenzänderungen im *GUCY2D*-Gen (ursächliches Gen für LCA Typ 1) auf zusätzliche *RD3*-Mutationen untersucht (Patientengruppe 2). Da die Genprodukte von *RD3* und *GUCY2D* im Rahmen der Phototransduktion in den Photorezeptoren interagieren, vermuteten wir, dass *RD3*-Mutationen möglicherweise einen Einfluss auf den Schweregrad des klinischen Erscheinungsbildes von *GUCY2D*-Patienten ausüben könnten.

In dieser gezielten Auswahl der Patienten nach phänotypischen bzw. genotypischen Kriterien unterscheidet sich die vorliegende Arbeit ebenso von den vorangehenden *RD3*-Screening-Studien wie in der ethnischen Zusammensetzung des hier untersuchten

Patientenkollektivs, welche einen weiteren möglichen Einflussfaktor auf die Häufigkeit von *RD3*-Mutationen darstellt.

Das *RD3*-Gen der betreffenden Patienten wurde zunächst durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert, dann mittels Agarosegel-Elektrophorese isoliert und anschließend sequenziert. Dabei wurden im untersuchten Patientenkollektiv bei 34 der 88 Patienten Sequenzänderungen im *RD3*-Gen identifiziert. Dabei handelte es sich um sieben unterschiedliche Veränderungen der Basenfolge: c.5A>T (p.H2L), c.141C>T (p.R47C), c.170G>T (p.G57V), c.296+28G>A, c.297-124G>A, c.297-86A>T und c.486C>T. Die gefundenen Sequenzänderungen kamen allerdings in keinem der Fälle als Ursache der vorliegenden Netzhautdystrophie in Frage, da es sich um unwirksame Polymorphismen (in Form von heterozygoten Veränderungen bzw. Veränderungen innerhalb von Introns) handelte.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass Mutationen im *RD3*-Gen als eine extrem seltene Ursache der LCA anzusehen sind und steht damit im Einklang mit den Aussagen bisheriger Studien.

6. Summary

Leber's congenital amaurosis (LCA) is a form of hereditary early onset retinal dystrophy. Patients affected by this disease show severe degenerative alterations of the retina in earliest infancy leading to serious visual impairment and severely reduced responses in the electroretinography (ERG). About 70 % of the cases can be explained by the currently known 23 genes which – in the mutated state – cause LCA. Mutations in the *RD3* gene reveal an autosomal-recessive inheritance and lead to a particular severe course of the disease (LCA type 12). The first *RD3* patients were described in 2006 and 2012.

In the present study the DNA of 88 systematically selected patients with retinal dystrophy was tested for changes in the *RD3* gene to get information about the incidence of such mutations as a reason for the disease. The patients were selected by two different aspects:

Group 1: Presuming a genotype-phenotype correlation in patients with *RD3* mutations, 32 patients (with to date unknown cause of their disease) were chosen for mutation screening from the database of the Laboratory of Molecular Ophthalmology in Gießen. These patients resemble to the clinical features of the so far described *RD3* patients (especially concerning vision loss and ERG). In addition the DNA of 33 other patients with severe forms of retinal degeneration outside of these strict criteria were included in the screening.

Group 2: Furthermore 23 patients with sequence changes in the *GUCY2D* gene (causing LCA type 1) were tested for additional *RD3* mutations. Due to the interaction of the gene products of *RD3* und *GUCY2D* in the process of phototransduction a possible influence of *RD3* mutations on the severity of the *GUCY2D* patients' clinical appearance was supposed.

The systematical selection of the patients following phenotypical respectively genotypical criteria distinguishes the present work from former studies as well as its ethnical distribution that represents a possible influence factor on the incidence of *RD3* mutations.

The *RD3* gene of the selected patients was first amplified by polymerase chain reaction, then isolated by an agarose gel electrophoresis and finally sequenced. In this process *RD3* sequence changes were identified in 34 of the 88 patients. Seven different

alterations of the base order were detected: c.5A>T (p.H2L), c.141C>T (p.R47C), c.170G>T (p.G57V), c.296+28G>A, c.297-124G>A, c.297-86A>T and c.486C>T. However, the mentioned sequence changes could not be regarded to cause the patients' retinal dystrophies, but represented non-effective polymorphisms (alterations in the heterozygous state respectively located in introns).

The results reveal that mutations in the *RD3* gene seem to be an extremely rare cause of LCA. This conclusion is in accord with the statements of the former studies on that subject.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	autosomal-dominant
ar	autosomal-rezessiv
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COD	Cone dystrophy = Zapfen-Dystrophie
CRD	Cone-rod dystrophy = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
C	Cystein (als Aminosäure), Cytosin (als Base eines Nukleotids)
c.	Sequenzänderung innerhalb der DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
EOSRD	Early onset severe retinal dystrophy = schwere Netzhautdystrophie mit frühem Krankheitsbeginn
G	Glycin (als Aminosäure), Guanin (als Base eines Nukleotids)
GUCY2D	(retinale) Guanylatzyklase 2D
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
LCA	Leber's congenital amaurosis = Lebersche kongenitale Amaurose
LEA-Lesetafeln	Lesetafeln nach Lea-Hyvärinen
LH-Lesetafeln	Lesetafeln nach Lea-Hyvärinen
logMAR	dekadischer Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels (= minimum angle resolution)
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD	optische Dichte
p.	Sequenzänderung der Proteinsequenz
R	Arginin
RCD	Rod-cone dystrophy = Stäbchen-Zapfen-Dystrophie
Ret. Dyst.	Retinale Dystrophie
RP	Retinopathia pigmentosa = Retinitis pigmentosa
SNP	single nucleotide polymorphism
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
V	Valin

8. Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> Schematisch vereinfachte Darstellung der menschlichen Netzhaut mit Lokalisation von LCA-Gen-Produkten in den verschiedenen retinalen Zellen (http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis).....	7
<u>Abbildung 2:</u> Schematische Darstellung der Phototransduktion in einer Stäbchenzelle (http://www.retina-international.org/files/sci-news/viscas.htm).....	9
<u>Abbildung 3:</u> Schematische Darstellung der Funktion des RD3-Proteins in einer Photorezeptorzelle.....	12
<u>Abbildung 4:</u> Zusammensetzung des Gesamtkollektivs nach Patientengruppen.....	33
<u>Abbildung 5:</u> Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach dem Geschlecht.....	34
<u>Abbildung 6:</u> Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach den jeweiligen Diagnosen, unter denen die Patienten in der Datenbank erfasst waren.....	35
<u>Abbildung 7:</u> Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach der Herkunft der Patienten.....	36

9. Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1-1</u> : Betroffene Gene bei LCA-Patienten	3
<u>Tabelle 1-2</u> : Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei LCA-Patienten	5
<u>Tabelle 2-1</u> : Geräte	20
<u>Tabelle 2-2</u> : Chemikalien	21
<u>Tabelle 2-3</u> : Stammlösungen	21
<u>Tabelle 2-4</u> : Enzyme	22
<u>Tabelle 2-5</u> : Kits	22
<u>Tabelle 2-6</u> : Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	25
<u>Tabelle 2-7</u> : Primerpaare für die Exons 2 und 3 des <i>RD3</i> -Gens	25
<u>Tabelle 2-8</u> : Ablauf einer PCR	27
<u>Tabelle 3-1</u> : Zusammensetzung des Gesamtkollektivs nach Patientengruppen	33
<u>Tabelle 3-2</u> : Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach dem Geschlecht	33
<u>Tabelle 3-3</u> : Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach den jeweiligen Diagnosen, unter denen die Patienten in der Datenbank erfasst waren	34
<u>Tabelle 3-4</u> : Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach der Herkunft der Patienten	35
<u>Tabelle 3-5</u> : Patientengruppe 1a (22 Patienten)	44
<u>Tabelle 3-6</u> : Patientengruppe 1b (10 Patienten)	54
<u>Tabelle 3-7</u> : Patientengruppe 1c (33 Patienten)	61
<u>Tabellen 3-8</u> : Patientengruppe 2: 23 Patienten mit Sequenzänderungen im <i>GUCY2D</i> -Gen	63
<u>Tabelle 3-9</u> : Verteilung der Polymorphismen innerhalb des Patientenkollektivs	65
<u>Tabelle 3-10</u> : Verteilung der Polymorphismen nach Patientengruppen	66
<u>Tabelle 3-11</u> : Verteilung der Polymorphismen nach Geschlecht	66
<u>Tabelle 3-12</u> : Verteilung der Polymorphismen nach in der Datenbank erfassten Diagnosen	66
<u>Tabelle 3-13</u> : Verteilung der Polymorphismen nach der Herkunft der Patienten	67
<u>Tabelle 3-14</u> : Erläuterungen zu den gefundenen Kombinationen von Polymorphismen	68

10. Literaturverzeichnis

- 1 Acland GM, Aguirre GD. Retinal degenerations in the dog: IV. Early retinal degeneration (erd) in Norwegian elkhounds. *Exp Eye Res* 1987; 44(4):491-521
- 2 Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 2005; 12(6):1072-1082
- 3 Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28(1):92-95
- 4 Acland GM, Fletcher RT, Gentleman S, Chader GJ, Aguirre GD. Non-allelism of three genes (rcd1, rcd2 and erd) for early-onset hereditary retinal degeneration. *Exp Eye Res* 1989; 49(6):983-998
- 5 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland, 2002, ISBN: 0-8153-3218-1.
- 6 Aldahmesh MA, Al-Owain M, Alqahtani F, Hazzaa S, Alkuraya FS. A null mutation in CABP4 causes Leber's congenital amaurosis-like phenotype. *Mol Vis* 2010; 16:207-212
- 7 Augustin AJ. *Augenheilkunde*. Berlin: Springer, 2007, ISBN: 3540304541.
- 8 Azadi S, Molday LL, Molday RS. RD3, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(49):21158-21163
- 9 Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358(21):2231-2239
- 10 Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J et al. Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* 2005; 2(11):e333
- 11 Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A, Jacobs JB, Hauck B, Zeleniaia O et al. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* 2008; 16(3):458-465
- 12 Bowne SJ, Liu Q, Sullivan LS, Zhu J, Spellicy CJ, Rickman CB et al. Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-

- specific photoreceptor degeneration? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(9):3754-3765
- 13 Cavalli Sforza LL, Menozzi G, Piazza L. The history and geography of human genes. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press, 1996, ISBN: 0691029059.
 - 14 Chang B, Heckenlively JR, Hawes NL, Roderick TH. New mouse primary retinal degeneration (rd-3). *Genomics* 1993; 16(1):45-49
 - 15 Chiang PW, Wang J, Chen Y, Fu Q, Zhong J, Chen Y et al. Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2012; 44(9):972-974
 - 16 Chung DC, Traboulsi EI. Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions. *J AAPOS* 2009; 13(6):587-592
 - 17 Danciger JS, Danciger M, Nusinowitz S, Rickabaugh T, Farber DB. Genetic and physical maps of the mouse rd3 locus; exclusion of the ortholog of USH2A. *Mamm Genome* 1999; 10(7):657-661
 - 18 Danciger M, Ogando D, Yang H, Matthes MT, Yu N, Ahern K et al. Genetic modifiers of retinal degeneration in the rd3 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(7):2863-2869
 - 19 Dejneka NS, Surace EM, Aleman TS, Cideciyan AV, Lyubarsky A, Savchenko A et al. In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. *Mol Ther* 2004; 9(2):182-188
 - 20 den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 2010; 120(9):3042-3053
 - 21 den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, Velde-Visser SD, Kellner U et al. Leber Congenital Amaurosis and Retinitis Pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet* 2001; 69(1):198-203
 - 22 den Hollander AI, Koenekoop RK, Mohamed MD, Arts HH, Boldt K, Towns KV et al. Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2007; 39(7):889-895
 - 23 den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KE et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet* 2006; 79(3):556-561

- 24 Drenckhahn D, Beninghoff A. Anatomie - Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16 ed. München: Elsevier GmbH, 2004, ISBN: 3437423509.
- 25 Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T et al. Null RPGRIP1 alleles in patients with leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2001; 68(5):1295-1298
- 26 Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Coppieters F, Kohl S, Lopez I, Collin RW et al. IQCB1 mutations in patients with leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(2):834-839
- 27 Falk MJ, Zhang Q, Nakamaru-Ogiso E, Kannabiran C, Fonseca-Kelly Z, Chakarova C et al. NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2012; 44(9):1040-1045
- 28 Farrar GJ, Millington-Ward S, Chadderton N, Humphries P, Kenna PF. Gene-based therapies for dominantly inherited retinopathies. *Gene Ther* 2012; 19(2):137-144
- 29 Freund CL, Wang QL, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, Sheffield VC et al. De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 1998; 18(4):311-312
- 30 Friedman JS, Chang B, Kannabiran C, Chakarova C, Singh HP, Jalali S et al. Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am J Hum Genet* 2006; 79(6):1059-1070
- 31 Gerber S, Perrault I, Hanein S, Barbet F, Ducroq D, Ghazi I et al. Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet* 2001; 9(8):561-571
- 32 Grehn F. Augenheilkunde. 30 ed. Berlin: Springer Verlag, 2008, ISBN: 3540752641.
- 33 Gu S, Lennon A, Li Y, Lorenz B, Fossarello M, North M et al. Tubby-like protein-1 mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Lancet* 1998; 351(9109):1103-1104
- 34 Gu S, Thompson DA, Srisailapathy Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 1997; 17(2):194-197
- 35 Haire SE, Pang J, Boye SL, Sokal I, Craft CM, Palczewski K et al. Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout

- mouse retina treated with AAV-GC1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(9):3745-3753
- 36 Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2(1):7
 - 37 Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D et al. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2004; 23(4):306-317
 - 38 Heckenlively JR, Chang B, Peng C, Hawes NL, Roderick TH. Variable expressivity of rd-3 retinal degeneration dependent on background strain. In: Hollyfield JG, Anderson RE, LaVail MM, editors. *Retinal degeneration: clinical and laboratory applications*. New York: Plenum Press, 1993: 273-280
 - 39 Henderson RH, Williamson KA, Kennedy JS, Webster AR, Holder GE, Robson AG et al. A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol Vis* 2009; 15:2442-7.:2442-2447
 - 40 Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, Aleman TS, Schwartz SB, Cideciyan AV et al. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol Ther* 2006; 13(6):1074-1084
 - 41 Jansohn M, Aigner A. *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 4 ed. München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., 2007, ISBN: 9783827415370.
 - 42 Kaplan J, Hanein S, Delphin N, Gerber S, Edelson C, Aboussair N et al. Rd3 Mutations Are Responsible For Gucy2d-like Lca. *ARVO Meeting Abstracts* 2012; 53(6):4535 Online Reference:
<http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/53/6/4535>.
 - 43 Kaufman PL, Alm A. *Adler's Physiology of the eye*. 10 ed. St. Louis: Mosby, 2003, ISBN: 0-323-01136-5.
 - 44 Keen TJ, Mohamed MD, McKibbin M, Rashid Y, Jafri H, Maumenee IH et al. Identification of a locus (LCA9) for Leber's congenital amaurosis on chromosome 1p36. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(5):420-423
 - 45 Kellner U, Renner AB, Tillack H. Hereditäre Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien - Teil 2: Differenzialdiagnose. *Ophthalmologe* 2004; 101(4):397-412
 - 46 Koenekoop RK, Wang H, Majewski J, Wang X, Lopez I, Ren H et al. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet* 2012; 44(9):1035-1039

- 47 Kukekova AV, Goldstein O, Johnson JL, Richardson MA, Pearce-Kelling SE, Swaroop A et al. Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3. *Mamm Genome* 2009; 20(2):109-123
- 48 Kukekova AV, Nelson J, Kuchtey RW, Lowe JK, Johnson JL, Ostrander EA et al. Linkage mapping of canine rod cone dysplasia type 2 (rcd2) to CFA7, the canine orthologue of human 1q32. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(3):1210-1215
- 49 Kwok MC, Holopainen JM, Molday LL, Foster LJ, Molday RS. Proteomics of photoreceptor outer segments identifies a subset of SNARE and Rab proteins implicated in membrane vesicle trafficking and fusion. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7(6):1053-1066
- 50 Lai CM, Yu MJ, Brankov M, Barnett NL, Zhou X, Redmond MT et al. Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65^{-/-} knockout mouse eye results in limited rescue. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2(1):3
- 51 Lavorgna G, Lestingi M, Ziviello C, Testa F, Simonelli F, Manitto MP et al. Identification and characterization of C1orf36, a transcript highly expressed in photoreceptor cells, and mutation analysis in retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308(3):414-421
- 52 Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, Weber M, Deschamps JY, Nivard D et al. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 2007; 14(4):292-303
- 53 Leber T. Über Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Albrecht von Graefes Arch Ophthal* 1869; 15:1-25
- 54 Li Y, Wang H, Peng J, Gibbs RA, Lewis RA, Lupski JR et al. Mutation survey of known LCA genes and loci in the Saudi Arabian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(3):1336-1343
- 55 Linberg KA, Fariss RN, Heckenlively JR, Farber DB, Fisher SK. Morphological characterization of the retinal degeneration in three strains of mice carrying the rd-3 mutation. *Vis Neurosci* 2005; 22(6):721-734
- 56 Linz U, Degenhardt H. Die Polymerase-Kettenreaktion: Ein Überblick. *Naturwissenschaften* 1990; 77(11):515-530
- 57 Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie & Pathobiochemie*. 8 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007, ISBN: 3540326804.

- 58 Lorenz B, Preising M, Stieger K. Retinal blinding disorders and gene therapy-- molecular and clinical aspects. *Curr Gene Ther* 2010; 10(5):350-370
- 59 Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P et al. Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(3):415-420
- 60 Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 2 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009, ISBN: 3827415209.
- 61 Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu QM, Spencer M, Laura R et al. Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5535-5539
- 62 Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009; 374(9701):1597-1605
- 63 Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358(21):2240-2248
- 64 Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C et al. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1997; 17(2):139-141
- 65 Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 2009; 118(1):69-77
- 66 Mataftsi A, Schorderet DF, Chachoua L, Boussalah M, Nouri MT, Barthelmes D et al. Novel TULP1 mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(11):5160-5167
- 67 Molday LL, Yan P, Djajadi H, Szczgiel L, Boye S, Chiodo V et al. AAV-mediated Rescue Of Rod Photoreceptors In The Rd3 Mouse Model Of Leber Congenital Amaurosis Type 12 (LCA12). *ARVO Meeting Abstracts* 2012; 53(6):1902 Online Reference: <http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/53/6/1902>.
- 68 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263-73.:263-273
- 69 Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(4):1663-1672

- 70 Narfstrom K, Vaegan, Katz M, Bragadottir R, Rakoczy EP, Seeliger M. Assessment of Structure and Function Over a 3-year Period after Gene Transfer in RPE65-/- dogs. *Doc Ophthalmol* 2005; 111(1):39-48
- 71 Oyster CW. *The Human Eye: Structure and Function*. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1999, ISBN: 0-87893-645-9.
- 72 Pang JJ, Chang B, Kumar A, Nusinowitz S, Noorwez SM, Li J et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol Ther* 2006; 13(3):565-572
- 73 Pawlyk BS, Smith AJ, Buch PK, Adamian M, Hong DH, Sandberg MA et al. Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(9):3039-3045
- 74 Perrault I, Hanein S, Gerard X, Delphin N, Fares-Taie L, Gerber S et al. Spectrum of SPATA7 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat* 2010; 31(3):E1241-E1250
- 75 Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Ducrocq D, Dollfus H et al. Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2004; 75(4):639-646
- 76 Perrault I, Hanein S, Zanlonghi X, Serre V, Nicouneau M, foort-Delhemmes S et al. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet* 2012; 44(9):975-977
- 77 Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H et al. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1996; 14(4):461-464
- 78 Peshenko IV, Olshevskaya EV, Azadi S, Molday LL, Molday RS, Dizhoor AM. Retinal Degeneration 3 (RD3) Protein Inhibits Catalytic Activity of Retinal Membrane Guanylyl Cyclase (RetGC) and Its Stimulation by Activating Proteins. *Biochemistry* 2011; 50(44):9511-9519
- 79 Preising MN, Hausotter-Will N, Solbach MC, Friedburg C, Rüschemdorf F, Lorenz B. Mutations in RD3 are associated with an extremely rare and severe form of early onset retinal dystrophy EOSRD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(7):3463-3472
- 80 Preising MN, Lorenz B. Genetische Erkrankungen des retinalen Pigmentepithels. *Ophthalmologe* 2009; 106(4):311-319

- 81 Preising MN, Paunescu K, Friedburg C, Lorenz B. Genetische und klinische Heterogenität bei LCA-Patienten : Das Ende der Einheitlichkeit. Ophthalmologie 2007; 104(6):490-498
- 82 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239(4839):487-491
- 83 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74:5463-5467
- 84 Santos-Anderson RM, Tso MO, Wolf ED. An inherited retinopathy in collies. A light and electron microscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci 1980; 19(11):1281-1294
- 85 Schmidt RF, Lang F, Thews G. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 29 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005, ISBN: 3540218823.
- 86 Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Li Z, Yang X, Plagnol V et al. Recessive Mutations in KCNJ13, Encoding an Inwardly Rectifying Potassium Channel Subunit, Cause Leber Congenital Amaurosis. Am J Hum Genet 2011; 89(1):183-190
- 87 Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Bennicelli JL et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther 2010; 18(3):643-650
- 88 Sohocki MM, Bowne SJ, Sullivan LS, Blackshaw S, Cepko CL, Payne AM et al. Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. Nat Genet 2000; 24(1):79-83
- 89 Stieger K, Cronin T, Bennett J, Rolling F. Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. Methods Mol Biol 2011; 807:179-218
- 90 Stieger K, Lorenz B. Die Behandlung hereditärer Dystrophien und neovaskularer Erkrankungen der Retina durch AAV-vermittelten Gentransfer. Klin Monbl Augenheilkd 2008; 225(12):1009-1023
- 91 Stieger K, Lorenz B. Gene therapy for vision loss -- recent developments. Discov Med 2010; 10(54):425-433
- 92 Stieger K, Preising M, Friedburg C, Lorenz B. Gentherapie bei Mutationen im *RPE65*-Gen. Der Augenspiegel 2010;(01):20-21

- 93 Sun X, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bulgakov OV, Adamian M et al. Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Ther* 2010; 17(1):117-131
- 94 Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bainbridge JB et al. Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet* 2009; 18(12):2099-2114
- 95 Thiadens AA, den Hollander AI, Roosing S, Nabuurs SB, Zekveld-Vroon RC, Collin RW et al. Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet* 2009; 85(2):240-247
- 96 Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA et al. Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 2001; 28(2):123-124
- 97 Traboulsi EI. *Genetic Diseases of the Eye*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2012, ISBN: 978-0-19-532614-7.
- 98 Wang H, den Hollander AI, Moayed Y, Abulimiti A, Li Y, Collin RW et al. Mutations in SPATA7 cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009; 84(3):380-387
- 99 Wang X, Wang H, Cao M, Li Z, Chen X, Patenia C et al. Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat* 2011; 32(12):1450-1459
- 100 Watson JD. *Molekularbiologie*. 6 ed. München: Pearson Studium, 2011, ISBN: 9783868940299.
- 101 Welsch U, Sobotta J. *Lehrbuch Histologie*. München , Jena: Urban und Fischer, 2003, ISBN: 3437424203.
- 102 Wolf ED, Vainisi SJ, Santos-Anderson R. Rod-cone dysplasia in the collie. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173(10):1331-1333
- 103 Woodford BJ, Liu Y, Fletcher RT, Chader GJ, Farber DB, Santos-Anderson R et al. Cyclic nucleotide metabolism in inherited retinopathy in collies: a biochemical and histochemical study. *Exp Eye Res* 1982; 34(5):703-714
- 104 Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Benav H, Besch D, Bruckmann A, Gabel VP et al. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc Biol Sci* 2011; 278(1711):1489-1497

11. Internetreferenzen

- <http://www.genenames.org/guidelines.html>
- <http://www.jaxmice.jax.org/strain/000726.html>
- <https://mutalyzer.nl/check>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/343035>
- <http://www.retina-international.org/files/sci-news/viscas.htm>
- <http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/leber-congenital-amaurosis/>
- <http://www.2-sight.eu/en/home-en>

12. Publikationsverzeichnis

Preising MN, Hausotter-Will N, Solbach MC, Friedburg C, Rüschen-dorf F, Lorenz B.
Mutations in RD3 are associated with an extremely rare and severe form of early onset
retinal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 8;53(7):3463-72.

13. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Rodgau, den 03.02.2013

Manuel Corbinian Solbach

14. Danksagung

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz und Herrn Dr. rer. medic. med. habil. Markus Preising für die Ermöglichung und allzeit freundliche und hervorragende Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ferner danke ich dem ganzen Team des Labors für Molekulare Ophthalmologie, besonders Frau Annabella Janise, die mir bei meinen Laborarbeiten jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Natürlich danke ich auch meiner Familie, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit stets mit allen Kräften unterstützt hat.

